

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**  
**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR**  
**MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**  
**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**AZ ELSŐ EUKARIÓTA NIKOTINSAV  
LEBONTÁSI ÚTVONAL FELDERÍTÉSE**  
***ASPERGILLUS NIDULANS*-BAN**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**BOKOR ESZTER**

**TÉMAVEZETŐ:**  
**DR. HAMARI ZSUZSANNA**  
**EGYETEMI DOCENS**



**SZEGED**

**2019**

## Tartalom

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2. BEVEZETÉS.....	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
3.1. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség jellemzése.....	6
3.2. A nikotinsav élettani szerepe.....	7
3.3. A nikotinsav hasznosítása prokariótákban .....	8
3.4. Az első eukarióta nikotinsav degradációs klaszter (NDC1) felfedezése .....	11
4. CÉLKITŰZÉS.....	15
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
5.1. Felhasznált mikroorganizmusok.....	17
5.2. Tenyésztési körülmények .....	17
5.2.1. <i>A. nidulans</i> tenyésztésére felhasznált táptalajok.....	17
5.2.2. <i>Escherichia coli</i> tenyésztéséhez felhasznált táptalajok.....	18
5.2.3. Az <i>A. nidulans</i> tenyésztési körülményei.....	18
5.3. Oldatok .....	18
5.3.1. DNS izoláláshoz felhasznált oldatok .....	18
5.3.2. <i>E. coli</i> kompetens sejt gyártáshoz és transzformálásához felhasznált oldatok .....	18
5.3.3. <i>Aspergillus</i> transzformáláshoz felhasznált oldatok.....	19
5.3.4. Southern-blottoláshoz felhasznált oldatok.....	19
5.3.5. Southern-hibridizációhoz felhasznált oldatok .....	19
5.3.6. Horizontális gél elektroforézishez használt oldatok .....	19
5.3.7. HPLC-MS mérésekhez használt oldatok .....	19
5.4. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek készítése.....	19
5.5. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek transzformálása .....	20
5.6. <i>Aspergillus</i> transzformálás .....	20
5.7. <i>A. nidulans</i> törzsek létrehozása keresztezéssel.....	21
5.8. Nukleinsav-manipulációhoz felhasznált módszerek.....	22
5.8.1. Totál DNS kivonás <i>A. nidulans</i> -ból.....	22
5.8.2. RNS kivonás <i>A. nidulans</i> -ból, cDNS szintézis .....	22
5.8.3. Plazmid minipreparátumok készítése <i>E. coli</i> -ból .....	23
5.8.4. DNS-minták agaróz gélelektroforézise.....	23
5.8.5. DNS visszanyerése agaróz gélből.....	23
5.8.6. DNS emésztése restrikciós endonukleázokkal .....	23
5.8.7. DNS-molekulák ligálása.....	23
5.8.8. Polimeráz láncreakció (PCR).....	24
5.8.9. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR).....	24
5.8.10. Southern-hibridizáció.....	24
5.9. A <i>hxnV</i> és <i>hxnW</i> cDNS szekvenciák felsokszorozása .....	24
5.10. A szubsztitúciós kazetták létrehozása a <i>hxnS</i> , <i>hxnS/hxnT</i> , <i>hxnV</i> , <i>hxnX</i> , <i>hxnW</i> , <i>hxnM</i> és <i>hxnN</i> gének deléciójához .....	25
5.11. GFP-fúziós konstrukciók létrehozása .....	27
5.11.1. A <i>hxnV-gfp</i> -t (C-terminális GFP-fúziós fehérjét) kódoló konstrukció létrehozása ....	27
5.11.2. A <i>gfp-hxnX</i> -et (N-terminális GFP-fúziós fehérjét) kódoló konstrukció létrehozása ..	28
5.12. <i>In silico</i> analízis .....	29
5.12.1. Ortológ keresés .....	29
5.12.2. Lokalizációs szignál keresés.....	29
5.12.3. Homológia keresés.....	29
5.13. Mintaelőkészítés a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz .....	30
5.14. Mintaelőkészítés és extrakció GC-MS és HPLC-MS analízishez.....	30
5.15. Mérési körülmények GC-MS analízis esetén .....	30
5.16. Mérési körülmények HPLC-MS analízis esetén.....	31

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	32
6.1. Az NDC1 klasztergéneken kívül további, nikotinsav lebontásban szerepet játszó gének keresése.....	32
6.1.1. <i>In vivo</i> megközelítés – <i>hxn6</i> mutáns transzformálása <i>A. nidulans</i> génbankkal, a <i>hxn6</i> mutáció azonosítása és az NDC2 génklaszter felfedezése.....	32
6.1.2. <i>In silico</i> megközelítés – a <i>hxn</i> gének egymáshoz viszonyított genomi elrendeződésének vizsgálata .....	35
6.2. A <i>hxnV</i> gén cDNS szekvenciájának meghatározása.....	38
6.3. Az NDC2 és NDC3 géntermékek <i>in silico</i> jellemzése .....	41
6.3.1. A HxnV jellemzése.....	41
6.3.2. A HxnX jellemzése.....	43
6.3.3. A HxnW jellemzése.....	45
6.3.4. A HxnM jellemzése .....	46
6.3.5. A HxnN jellemzése.....	49
6.4. A <i>hxnSΔ</i> , <i>hxnSΔ/hxnTΔ</i> , <i>hxnSΔ/hxnYΔ</i> , <i>hxnTΔ/hxnYΔ</i> és <i>hxnSΔ/hxnTΔ/hxnYΔ</i> deléciós törzsek létrehozása.....	51
6.4.1. A <i>hxnSΔ</i> deléciós törzs létrehozása <i>pabaA<sup>+</sup></i> szelekciós markerrel végzett génszubsztitúcióval.....	52
6.4.2. Többszörösen deléciós törzsek létrehozása .....	53
6.4.2.1. A <i>hxnS/hxnT</i> dupla deléció létrehozása .....	54
6.4.2.2. A <i>hxnS/hxnY</i> és <i>hxnT/hxnY</i> dupla deléciók létrehozása .....	56
6.4.2.3. <i>hxnS/hxnT/hxnY</i> deléció létrehozása .....	57
6.5. Az NDC2 és NDC3 gének deléciója .....	57
6.6. Az NDC1, NDC2 és NDC3 génekre deléciós törzsek NA hasznosítási képességének vizsgálata .....	60
6.7. A deléciós törzsek konstitutív <i>hxnR</i> ( <i>hxnR<sup>c</sup></i> ) háttérbe történő keresztezése NA származék hasznosítási tesztekhez és analitikai vizsgálatokhoz történő mintakészítés céljából .....	63
6.7.1. Deléciós <i>hxnR<sup>c</sup></i> törzsek növekedésének vizsgálata .....	63
6.8. A <i>hxnVΔ hxnR<sup>c7</sup></i> törzs esetén felhalmozódó kék pigment vizsgálata.....	65
6.8.1. A kék pigment képződésének vizsgálata halmozottan deléciós mutánsokban .....	67
6.9. Az útvonal intracelluláris színterének vizsgálata GFP-fúziós törzsek létrehozásával és vizsgálatával .....	69
6.9.1. A <i>hxnV-gfp</i> fúziós konstrukciót kifejező törzs létrehozása.....	70
6.9.2. A <i>gfp-hxnX</i> fúziós konstrukciót kifejező törzs létrehozása.....	71
6.10. További deléciós törzsek létrehozása analitikai vizsgálatokhoz .....	72
6.10.1. A <i>hxnMΔ/hxnXΔ</i> dupla mutáns törzs létrehozása analitikai vizsgálati anyagok előállítása céljából .....	72
6.10.2. A <i>hxnMΔ/hxnVΔ</i> dupla mutáns törzs létrehozása analitikai vizsgálati anyagok előállítása céljából .....	73
6.10.3. A <i>hxnMΔ/hxnWΔ</i> dupla mutáns törzs létrehozása analitikai vizsgálati anyagok előállítása céljából .....	73
6.11. A deléciós mutánsok GC-MS és HPLC-MS analízissel történő vizsgálata .....	75
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	81
8. SUMMARY .....	86
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	92
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	97
11. MELLÉKLETEK.....	98

# 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**2,5-DP:** 2,5-dihidroxipiridin

**6-NA:** 6-hidroxi-nikotinsav (6-hydroxynicotinic acid)

**Allp:** allopurinol

**AS:** aminosav

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool

**bp:** bázis pár

**cDNS:** komplementer DNS (complementary DNA)

**CM:** komplett táptalaj (complete medium)

**downst (down):** lentebbi (downstream)

**frw:** előre irányuló (forward)

**GC-MS:** gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

**GFP:** zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)

**HPLC-MS:** folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

**Hx:** hipoxantin

**kb:** kilobázis

**MM:** minimál táptalaj (minimal media)

**NA:** nikotinsav (nicotinic acid)

**NAA:** nikotinamid (nicotinic acid amide)

**NDC:** nikotinsav degradációs klaszter (nicotinic acid degradation cluster)

**nt:** nukleotid

**PCR:** polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

**PHI:** purin hidroxiláz I

**PHII:** purin hidroxiláz II

**RT-qPCR:** kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (Quantitative reat-time polymerase chain reaction)

**rev:** visszafelé irányuló (reverse)

**RFP:** vörös fluoreszcens fehérje (red fluorescent protein)

**SDR:** rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz (short chain dehydrogenase/reductase)

**upst (up):** fentebbi (upstream)

## 2. BEVEZETÉS

Habár számos mikroorganizmus képes a nikotinsav (NA) nitrogénforrásként történő hasznosítására, eddig mindössze prokariótákban vizsgálták a lebontási útvonalakat. Eukarióták esetében teljesen tisztázatlan a lebontás folyamata. Csoportunk munkáját megelőzően csak az útvonal feltételezett regulátora (HxnR), valamint az útvonal első lépése volt ismert *Aspergillus nidulans* modellorganizmusban, mely során a Purin hidroxiláz II (PHII) enzim a NA-at 6-hidroxi-nikotinsavvá (6-NA) alakítja át. Kutatócsoportunkban ezen ismeretekből kiindulva kezdtük el a NA lebontási útvonal tanulmányozását. Feltártunk egy NA katabolizmusban szerepet játszó géneket magába foglaló génklasztert, amelybe a transzkripció faktort és a PHII enzimet kódoló *hxnR* és *hxnS* gén, valamint további négy gén, a *hxnY*, *hxnT*, *hxnP* és *hxnZ* tartozik (Ámon és mtsai., 2017). A klaszter génjei koregulációt mutatnak, amely a NA és annak downstream metabolitjai, 6-NA és 2,5-dihidroxi-piridin (2,5-DP) által aktiválódnak és függenek a HxnR transzkripció faktortól, valamint az útvonal pozitív koregulátorától, az AreA-tól (Ámon és mtsai., 2017). A klaszter *hxnY*, *hxnT*, *hxnP* és *hxnZ* génjeire nézve deléció törzsek kombinált deléció párosításban is úgynevezett „leaky” fenotípust mutatnak, amely egyrészt előre jelzi a NA alternatív utakon történő lebontásának lehetőségét, másrészt pedig utal arra, hogy további, eddig még nem azonosított gének is szerepet játszanak a lebontásban.

Munkánk során célunk volt a NA lebontásban szerepet játszó további gének felfedezése és azok funkciójának elemzése deléció mutánsok előállításával, vizsgálatával, valamint analitikai vizsgálatokkal. Jelen doktori értekezésben a NA katabolikus útvonalban szerepet játszó, két klaszterbe rendeződő további öt gén felderítése és vizsgálata kerül bemutatásra deléció mutánsok létrehozásán és NA hasznosítási képességének vizsgálatán keresztül. Emellett bemutatjuk a deléció mutánsokkal végzett *in silico*, GC-MS és HPLC-MS vizsgálatok eredményeit. A vizsgálatok során kapott eredményeink alapján a NA lebontása eukariótákban a prokariótáktól eltérő módon, alternatív utakon történik. Az útvonal teljes feltárása során azonosított enzimek és enzimreakciók heterociklus módosító aktivitásuknál fogva, valószínűleg nagy érdeklődésre fognak szert tenni a gyógyszeriparban (hatóanyag prekursorok), valamint az agrokémia iparban (növényvédő szer prekursorok) a heterociklus alapú bioaktív hatóanyagok olcsó, környezetkímélő előállításához.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. Az *Aspergillus* nemzetség jellemzése

Az *A. nidulans* fonalagomba az *Ascomycota* törzs *Eurotiomycetes* osztályának *Eurotiales* rendjébe tartozó *Trichocomaceae* család *Aspergillus* nemzetségének tagja. A családba tartozó megközelítőleg 250 faj (Sugui és mtsai., 2014) közül a legtöbb csak aszexuális szaporodásra képes, szexuális ciklussal mindössze a nemzetség néhány faja rendelkezik, köztük az *A. nidulans*. Az *A. nidulans* termőteste egy kerek, zárt struktúra (kleisztotécium), amelyben a 8 aszkospórát tartalmazó aszkuszok találhatóak. A kleisztotéciumok falát differenciálódott hifák alkotják és a termőtestet kívülről vastag falú Hülle sejtek borítják be (Pontecorvo és mtsai., 1953).

Az *Aspergillus* fajok az ember környezetében előforduló egyik legelterjedtebb gombacsoport. Változatos élőhelyeken találkozhatunk velük, mint például a talajban, takarmánynövényeken, különböző élelmiszereken, valamint a bomló szerves anyagokban is (Fogarty, 1994). Az *Aspergillus* fajok számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Nagy mennyiségben termelnek az ipar számára komoly jelentőséggel bíró szerves savakat (pl. citromsav, glükonsav és itakonsav) és enzimeket (pl. cellulázok, amilázok, proteázok, lipázok és pektinázok), emellett egyes másodlagos metabolitok (pl. lovasztatin, különböző peptid antibiotikumok, és béta-laktám penicillin) gyógyászati hatóanyagokként váltak életünk nélkülözhetetlen részévé (Ward és mtsai., 2005). Ugyanakkor bizonyos másodlagos metabolitjaik egészségkárosító hatásukról hírhedtek. Az aflatoxin, ochratoxin, vagy az aflatoxin prekursora, a sterigmatocisztin (Schroeder & Kelton, 1975, Bennett & Papa, 1988) állati vagy emberi táplálékba jutása komoly gazdasági és egészségügyi problémát jelent.

Az *A. nidulans* fonalagomba a molekuláris biológiában gyakran alkalmazott modellszervezet, amely köszönhető a táptalajon és folyadékkultúrában történő gyors növekedésének; széles körben tanulmányozott szexuális-, vegetatív- és paraszexuális életciklusának; metabolikus sokoldalúságának; a hozzáférhető sokféle auxotróf mutánsnak, amelyek nagyban megkönnyítik a genetikai, illetve molekuláris biológiai vizsgálatokat; önkeresztezhetőségének; valamint haploid genomjának. Számos biológiai folyamatot vizsgáltak rajta, mellyel hozzájárult a metabolikus szabályozás, fejlődés, sejtciklus-szabályozás, mitokondriális intron terjedés, a kromatinszerkezet, citoskeleton-funkció, a humán genetikai betegségek és még számos más, sejtműködésben érintett folyamat megértéséhez (Pontecorvo és mtsai., 1953, Goldman & Kafer, 2004, Osmani & Mirabito, 2004). Mivel az *A. nidulans* teljes genomszekvenciája 2005 óta elérhető

([www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/aspergillus-genome-projects](http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/aspergillus-genome-projects)), képes a NA-at egyedüli nitrogénforrásként hasznosítani, és a '60-as évekből fennmaradt néhány elérhető NA nem-hasznosító mutáns, az *A. nidulans* megfelelő modellszervezetnek bizonyult az eukarióta NA katabolikus útvonal felderítéséhez.

### 3.2. A nikotinsav élettani szerepe

A NA (niacin, B3-vitamin) egy N-heterociklusos aromás vegyület, vízben oldódó vitamin, amely a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) és a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP) koenzimek prekursoraként számos metabolikus folyamatban játszik szerepet (pl. glikolízis, pentóz-foszfát ciklus) (Ikeda és mtsai., 1965). A NA-at a szervezet külső és belső forrásból is képes pótolni. Külső forrásból a táplálkozás útján, belső forrásból pedig a triptofán niacinná történő átalakítása révén, illetve a vastagbél normál mikroflórája által megtermelt niacin felvétele által (Said, 2011). A NA képes a plazmában növelni a high-density lipoprotein (HDL)-koleszterin szintjét, illetve csökkenteni a low-density lipoprotein (LDL)-koleszterin-, a trigliceridek és a lipoprotein koncentrációját, ezért potenciálisan fontos gyógyszerészeti hatóanyagnak tekinthető (MacKay és mtsai., 2012). A sztatinok (lipoprotein-koleszterin szint csökkentésére alkalmazott terápiás szerek) ismereteseek arról, hogy képesek 25-40%-kal csökkenteni a kardiovaszkuláris elégtelenségek kialakulásának esélyét és az emiatt bekövetkező elhalálozás lehetőségét. Abban az esetben azonban, amikor a sztatinokat NA-val kombinálták, 60-90%-os csökkenést tapasztaltak a szívelégtelenség és az emiatt bekövetkezett elhalálozások számában (Al-Mohaissen és mtsai., 2010). Ezeknek a statisztikai adatoknak a magyarázata az, hogy habár a sztatinok csökkentik az úgynevezett „rossz” koleszterinek (LDL-koleszterinek) szintjét, ha NA-val kombinálják, amely az úgynevezett „jó” koleszterinek (HDL-koleszterinek) mennyiségét növeli, akkor a sztatinok hatékonyabban védenek a kardiovaszkuláris elégtelenségekkel szemben.

A NA hiánya a pellagra nevű betegséghez vezethet, mely a nyálkahártyák gyulladásával, bőrelváltozásokkal, hasmenéssel és idegrendszeri rendellenességekkel jár. A NA hiánya, vagy nem optimális szintje leginkább alkoholbetegeknél, valamint Hartnup-kórban szenvedő egyéneknél fordul elő. Az utóbbi esetében a triptofán aminosav (AS) (az endogén NA szintézisének prekursora) transzportere szenved mutációt (Said, 2011).

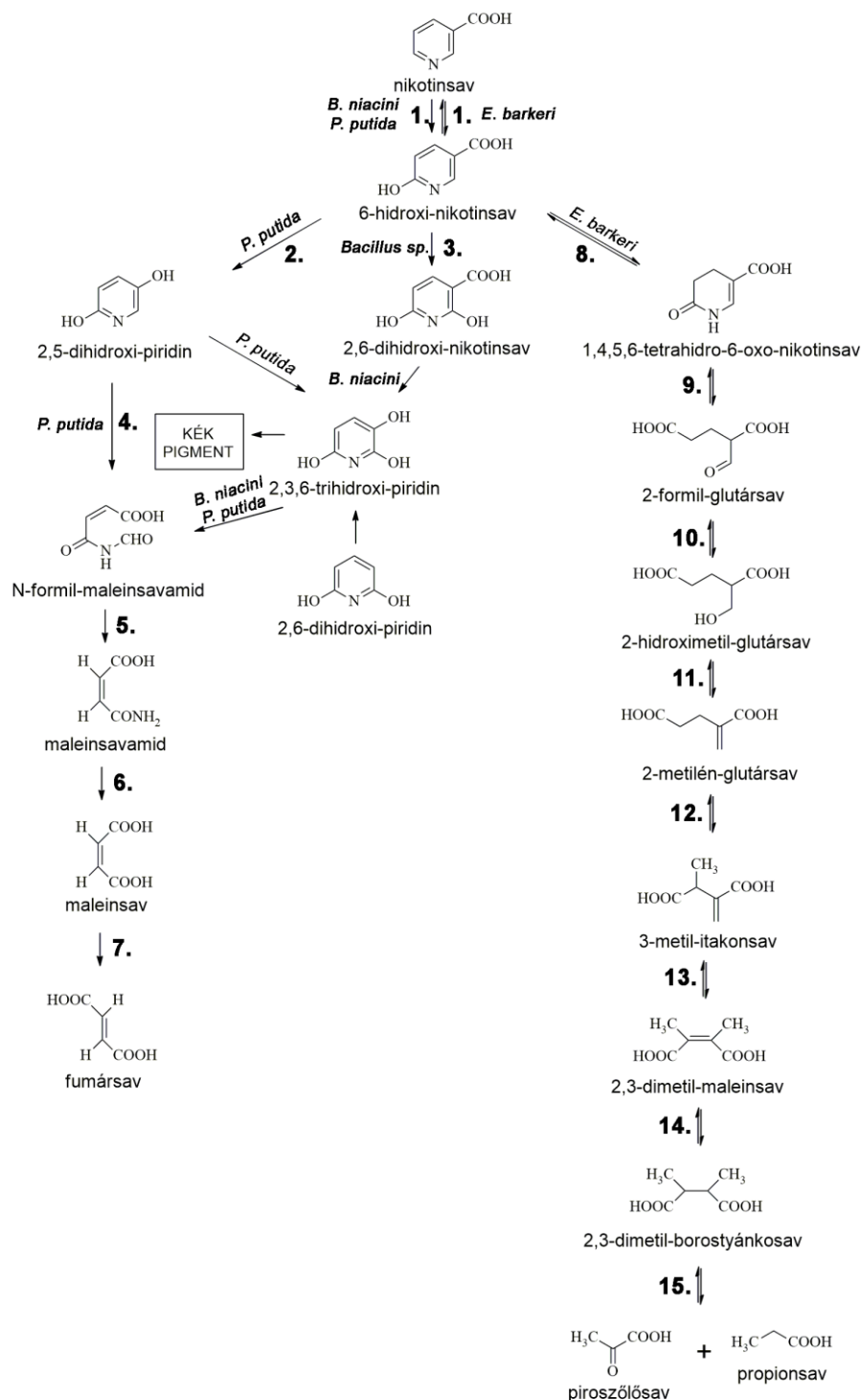
A NA a prokarióták számára szén- és nitrogénforrásként is hasznosítható, azonban jelenlegi ismereteink alapján a gombák számára csak nitrogénforrásként tud hasznosulni. A

prokarióta NA lebontását szolgáló biokémiai útvonalak tanulmányozásakor azonosított enzimek és metabolikus köztitermékek komoly ipari jelentőséggel bírnak a farmakológiában és az agrokémiában. Széles szubsztrát-specifitása miatt a nikotinsav-dehidrogenázt többek között *Mycobacterium* fajok által okozott tuberkulózis elleni szerek gyártása során alkalmazzák (Yoshida & Nagasawa, 2000). A 6-hidroxi-nikotinsav-3-monooxygenáz enzim működése során a 6-NA-ból 2,5-DP képződik, amely az 5-aminolevulinsav képződésének köztesterméke. Az 5-aminolevulinsavat növekedésszabályozó növényi hormonként, rovarölő szerként, valamint bőr- és szájrák fotodinamikus diagnózisa és terápiája során alkalmazzák (Nakano és mtsai., 1999), a 6-NA-at pedig elsősorban újgenerációs rovarölő szerek építőelemeként alkalmazzák (Schmid és mtsai., 2001). A mikrobiális enzimek továbbá eszközt jelentenek a komoly környezeti problémákat okozó toxikus vegyületek (pl. nikotin és hidroxipiridin) lebontásához is (Fetzner, 1998, Yoshida & Nagasawa, 2000, Wang és mtsai., 2004).

### **3.3. A nikotinsav hasznosítása prokariótákban**

A természetben a NA endogén módon szintetizálódhat a sejteken belül (kivételt képezhetnek egyes parazita fajok), de transzporterek segítségével be is juthat az extracelluláris környezetből (Pelczar & Porter, 1940, Tinschert és mtsai., 1997). Ahogy a 3.2. alfejezetben említettük, sok mikroorganizmus rendelkezik a NA nitrogén- és/vagy szénforrásként történő hasznosításának képességével. Prokariótákban a NA hasznosítást kiterjedten tanulmányozták és ennek alapján háromféle katabolikus útvonalat ismertek meg (1. ábra) (Behrman & Stanier, 1957, Ensign & Rittenberg, 1964, Alhapel és mtsai., 2006, Jimenez és mtsai., 2008).





**1. ábra: A NA lebontásának folyamata *Pseudomonas putida*, *Bacillus niacini* és *Eubacterium barkeri* esetében.**

Az ábrán a *P. putida* (Jimenez és mtsai., 2008), *B. niacini* (Ensign & Rittenberg, 1964) és *E. barkeri* (Alhapel és mtsai., 2006) baktériumok NA lebontási útvonalai láthatóak. A számok az adott lépést katalizáló enzimeket jelölik: 1. nikotinsav-hidroxiláz (nikotinsav-dehidrogenáz), 2. 6-hidroxi-nikotinsav-monooxygenáz, 3. 6-hidroxi-nikotinsav-dehidrogenáz, 4. piridin-2,5-diol dioxigenáz, 5. N-formil maleinsavamid deformiláz, 6. maleinsavamid amidohidroláz, 7. maleinsav izomeráz, 8. 6-hidroxi-nikotinsav-reduktáz, 9. enamidáz, 10. 3-hidroxi-izobutirát/foszfoglukonát-dehidrogenáz, 11. szerin-dehidratáz-szerű enzim, 12. B12-koenzim-dependens 2-metilén-glutarát-mutáz, 13. 3-metilitakonát-izomeráz, 14. (2R,3S)-dimetilmalát-dehidratáz, 15. (2R,3S)-dimetilmalát-liáz.

A NA lebontás legelső lépése megegyezik mindhárom típusú útvonalban. Ez a lépés a NA átalakítása 6-NA-vá egy nikotinsav-hidroxiláz (nikotinsav-dehidrogenáz) által (1. ábra). Ezt követően a lebontás a *Pseudomonas* fajok esetén (például *P. putida*, *P. fluorescens*) a 6-NA 2,5-DP-né történő átalakításával folytatódik, amelyben egy 6-hidroxi-nikotinsav-monooxygenáz játszik szerepet (1. ábra). A 2,5-DP egy N-formil maleinsavamid, majd maleinsavamid intermediereken keresztül maleinsavvá alakul piridin-2,5-diol dioxigenáz, N-formil maleinsavamid deformiláz és maleinsavamid amidohidroláz segítségével (Jimenez és mtsai., 2008) (1. ábra). Az utóbbi amidohidroláz aktivitás során a maleinsavamid köztitermék amid csoportja lecserélődik egy hidroxil csoportra. Az amid csoport végső soron ammóniummá alakulva nitrogénforrásként hasznosul. A maleinsavamid amidcsoportjának eltávolításával létrejött maleinsav fumársavvá alakul (egy maleinsav izomeráz révén) és betáplálódik a Szent-Györgyi-Krebs-ciklusba és végső soron szén-forrásként hasznosul (Jimenez és mtsai., 2008). A *Bacillus niacini* baktériumban a 6-NA-ból egy 2,6-dihidroxi-nikotinsav (2,6-DNA) intermediereken keresztül (6-hidroxi-nikotinsav-dehidrogenáz segítségével) jön létre a maleinsavamid, a lebontás további lépései pedig megegyeznek a *Pseudomonas* fajok esetében leírt útvonal lépéseivel (Ensign & Rittenberg, 1964) (1. ábra). Mind a *Pseudomonas*, mind a *Bacillus* által képviselt útvonal esetén feltételezik egy 2,3,6-trihidroxi piridin származék létrejöttét a piridingyűrű felnyílása előtt (az N-formil maleinsavamid keletkezése előtt), amelyből nem enzimatis úton egy kék színű pigment, egy azakinon származék jön létre (Ensign & Rittenberg, 1963) (1. ábra).

A NA-ból keletkezett 6-NA lebontásának harmadik lehetséges módját a *Clostridiales* rend bizonyos tagjai, például az *Eubacterium barkeri* vizsgálata során írták le (1. ábra). Az *E. barkeri* a *P. putida* illetve a *B. niacini* degradációjától teljesen eltérő, anaerob lebontási útvonallal rendelkezik. Az *E. barkeri*-ben egy kilenc génből álló klaszter egyedi fermentációs útvonalat biztosít, amelyben a NA-ból végül piroszölősav és propionsav képződik. A NA 6-NA-vá történő oxidációját egy négy alegységes (nem szelenocisztein) szelén tartalmú nikotinsav-dehidrogenáz enzim katalizálja. A 6-NA-at a 6-hidroxi-nikotinsav-reduktáz redukálja 1,4,5,6-tetrahidro-6-oxo-nikotinsavvá, amelyet az enamidáz enzim ammóniummá és (S)-2-formil-glutaráttá hidrolizál (1. ábra). Ez utóbbit egy 3-hidroxi-izobutirát/foszfoglukonát-dehidrogenáz enzim tovább redukálja (S)-2-hidroxi-metil-glutaráttá, majd feltételezhetően egy szerin-dehidratáz-szerű enzim 2-metilénglutarátot képez, amely a B12-koenzim-dependens 2-metilénglutarát-mutáz, a 3-metil-takónát-izomeráz, a (2R,3S)-dimetil-malát-dehidratáz és a (2R,3S)-dimetil-malát-liáz működésén keresztül piroszölősavvá alakul (1. ábra). *In silico* elemzéssel kilenc *Proteobacteria* esetében azonosították az *E. barkeri* NA lebontásának első

három enzimét kódoló gének homológjait, de a teljes NA lebontási útvonalat nem tárták fel, bár az útvonal teljes megismerése váratlan újdonságokat tartogathat (Alhapel és mtsai., 2006). A prokarióta lebontási útvonal első enzimeinek *in silico* összehasonlítása azt mutatta, hogy az *E. barkeri*-ben, a *Pseudomonas aeruginosa*-ban és az *Azorhizobium caulinodans*-ban előforduló nikotinsav-hidroxilázok nem állnak evolúciós kapcsolatban egymással, ami azt jelenti, hogy a nikotinsav-hidroxilázok egymástól függetlenül, számos alkalommal jelentek meg az evolúció során (Ámon és mtsai., 2017).

### **3.4. Kék pigment felhalmozódás a *Pseudomonas* és *Bacillus* útvonalak esetén**

*Pseudomonas* és *Bacillus* fajok, valamint *Arthrobacter crystallopoietes* esetén NA-at, mint egyedüli szén- és nitrogénforrást tartalmazó tápközegben történő tenyésztés során megfigyelték, hogy kék színű pigment halmozódik fel a telepekben, amely a tápközegbe is kibocsájtódik (Ensign & Rittenberg, 1963, Ensign & Rittenberg, 1964) Jimenez személyes közlés). A kék színű pigmentet kémiai jellemzése során egy monopiridol oxidációs termékeként írták le, amely neutrális, vagy enyhén lúgos oldatban anionként intenzív kék színnel rendelkezik, savas közegben pedig metál sóként precipitálódik. Az 1880-as és 1960-as évek között számos dipiridol és származékainak kémiai jellemzését publikálták, melyek közül egyesek esetén leírták, hogy kék színű pigmentet hoz létre, valószínűsíthetően egy tripiridol intermedier képződésen keresztül (1. ábra). A 2,3,4-trihidroxi piridin, 2,4,6-trihidroxi pikolin és a 4-metil-2,3,6 tripiridol vegyületek mindegyikéből lehetséges kék színű pigmentet létrehozni (Ensign & Rittenberg, 1963). Az *Ar. crystallopoietes* esetén úgy gondolták, hogy a kék színű pigmentet a Boyer és Kruger (Boyer & Kruger, 1957) által vizsgált azakinon néven emlegetett 6-hidroxi-2,3 piridon és 2-hidroxi-3,6 piridon tautomerek alkotják. Ezek az azakinonok mély lilás-barna, vagy vöröses-barna színűek, közönséges oldószerekben nem, vagy nehezen, alkalikus közegben pedig könnyen oldódnak, miközben intenzív kék színűvé válnak. A kék szín oxigenált közegben elhalványul az anyag bomlásával.

### **3.4. Az első eukarióta nikotinsav degradációs klaszter (NDC1) felfedezése**

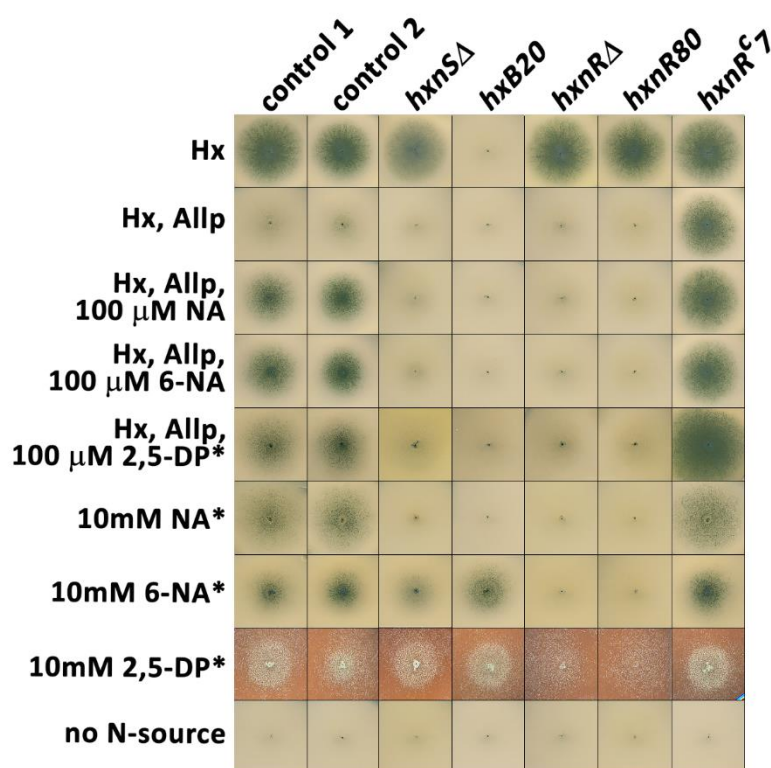
Kutatásaink eredményeképpen az *A. nidulans* VI. kromoszómáján felfedeztünk egy génklasztert, amely tartalmazza a NA lebontási útvonal génjeinek közös transzkripció faktorát (*hxnR*), valamint a *hxnS*, *hxnP*, *hxnZ*, *hxnY* és *hxnT* géneket (Ámon és mtsai., 2017). A kutatásunk során alkalmazott vizsgálati rendszerek megértését szolgálja, ha történeti sorrendben ismertetjük az NDC1 klaszter felfedezését.

Régóta ismert a purin hasznosítási útvonalban részt vevő purin hidroxiláz I enzim (PHI, a *hxA* gén terméke) (Lewis és mtsai., 1978, Mehra & Coughlan, 1989, Glatigny & Scazzocchio, 1995), mely a hipoxantint (Hx) xantinná, a xantint pedig húgysavvá képes hidroxilálni. A PHI enzim funkcióvesztéses mutánsainak létrehozása és elemzése során kiderült, hogy létezik egy másik enzim (purin hidroxiláz II, PHII), amely azon kívül, hogy molekulamérete és izoelektromos pontja igen közel áll a PHI-éhez és szintén molibdenopterin kofaktort igényel aktivitásához, képes a Hx→xantin átalakításra, azonban nem képes a xantin→húgysav átalakítás elvégzésére (Scazzocchio, 1973, Lewis és mtsai., 1978, Coughlan és mtsai., 1984). A xantin→húgysav átalakítást a mutánsokban PHI hiányában egy alternatív,  $\alpha$ -ketoglutarát-függő xantin-dehidrogenáz (XanA) végzi (Sealy-Lewis és mtsai., 1978). A PHII enzim biokémiai vizsgálata során kiderítették, hogy nem csak a Hx→xantin átalakítást, hanem a NA→6-NA konverziót is képes elvégezni. Az enzim regulációjára vonatkozóan megállapították, hogy a PHI-el ellentétben a PHII aktivitását nem befolyásolja sem a húgysav, sem pedig a purin hasznosítási útvonal transzkripció faktor (UaY), azonban a vad típusú törzsben Hx szubsztráton csak akkor detektálható PHII aktivitás, ha inducer mennyiségben (1 mM) NA-at, vagy 6-NA-at adnak a tápoldathoz (Scazzocchio, 1973). Ezek alapján a PHII-t a nikotinsav hasznosítási útvonal egyik enzimének tekintették és nem a purin lebontási útvonal részének. A PHII funkcióvesztéses mutánsokat két kategóriába lehetett besorolni. Az egyikbe azok a mutánsok tartoztak, amelyek Hx nitrogénforrás mellett allopurinolt (Allp, a PHI enzim gátlószere) tartalmazó, valamint NA nitrogénforrást tartalmazó táptalajon nem voltak képesek növekedni, de nőttek 6-NA nitrogénforrást tartalmazó táptalajon. Ezek a mutánsok a PHII-t kódoló gén funkcióvesztéses mutánsai (PHII-41, PHII-35). A második kategóriába azok a mutánsok tartoztak, amelyek a Hx nitrogénforrás mellett Allp-t tartalmazó, és a NA nitrogénforrást tartalmazó táptalajon kívül még a 6-NA nitrogénforrást tartalmazó táptalajon sem voltak képesek nőni. Ezekről azt gondolták, hogy vélhetőleg a PHII-t kódoló gén regulátorát érintő mutánsok (*hxnR2*, *hxnR3*). Konstitutív mutánsokat is felfedeztek, amelyek neutrális nitrogénforráson indukció nélkül is aktív fehérjét termeltek. Ezeket *aplA<sup>c</sup>* mutánsoknak nevezték (Scazzocchio és mtsai., 1973). A NA-at nem hasznosító mutánsok klasszikus genetikai vizsgálatával kimutatták, hogy nagyon erős kapcsoltság van a PHII-t kódoló gén és a *hxnR* regulátor gén, valamint a konstitutivitást okozó *aplA* gén között. A *hxnR* és *hxnS* allélok mutánsain kívül számos más, NA és 6-NA nem-hasznosító mutánst is izoláltak, melyek a genetikai keresztezésekkel végzett analízisek eredményeként a *hxnR* és *hxnS* alléloktól távolabb térképeződtek (Joan Kelly és Claudio Scazzocchio személyes közlés). A

létrehozott mutánsokon (a '60-as években) végzett genetikai munka nem került közlésre az azt követő idő során és egy kivételével (*hxn6*) a törzsek is elvesztek. Ezen több évtizedes eredmények alapján a 2000-es évek elején kezdte el csoportunk felderíteni a NA degradációjának genetikai hátterét. Az útvonal feltárásának kiindulási pontja egy olyan gén azonosítása volt az *A. nidulans* genomban, amely homológ a PHI-et kódoló *hxA* génnel. Ilyen gén a VI. kromoszómán található. A VI. kromoszóma génkönyvtárának transzformálása a PHII-41 és *hxnR2* mutánsokba egy olyan komplementáló kozmid izolálásához vezetett, mely mindkét törzs mutációját komplementálta. A kozmid szubklónozását és szekvenálását követően a PHII enzim génjeként az AN9178 gént azonosítottuk, a HxnR transzkripció faktor génjeként pedig az AN11197 gént. Ezeket a géneket a korábban publikált genetikai és biokémiai vizsgálatok alapján *hxnS*-nek és *hxnR*-nek neveztük el. A prokariótákban megfigyelhető klaszterbe rendeződés a funkcionálisan összefüggő gének esetén, valamint a *hxnS* és *hxnR* gének között korábban felfedezett erős kapcsoltság arra ösztönzött minket, hogy megvizsgáljuk a *hxnS* és *hxnR* génekkel szomszédos gének kifejeződését vad típusú törzsben indukció nélkül és 6-NA indukció mellett, valamint funkcióvesztéses *hxnR2* és funkciónyeréses *aplA<sup>c7</sup>* mutánsokban. A vizsgálat eredményeként egy 6 génből álló klasztert (*hxnR*, *hxnS*, *hxnP*, *hxnZ*, *hxnY* és *hxnT*) azonosítottunk, amelyet nikotinsav degradációs klaszternek (NDC) neveztünk el. A *hxnS* gén által kódolt PHII enzim (HxnS) (Ámon és mtsai., 2017) végzi a katabolikus útvonal első lépését, azaz 6' hidroxilálja a NA-at. A *hxnR* gén terméke egy Cys2His2 Zinc finger transzkripció faktor, amely a klasztergének kifejeződéséhez elengedhetetlenül szükséges (Ámon és mtsai., 2017). A *hxnT* és a *hxnY* géntermékek (FMN oxidoreduktáz és egy  $\alpha$ -ketoglutarát függő dioxigenáz) egy 6-NA szubsztrátot érintő útvonalban játszanak szerepet. A *hxnT* $\Delta$  és a *hxnY* $\Delta$  mutánsok NA hasznosítási profilja ellentmondásosnak bizonyult (NA nitrogénforráson képesek nőni, de 6-NA nitrogénforráson csökkent növekedést mutatnak), amely alapján azt feltételezzük, hogy egy alternatív útvonal működik a NA katabolikus folyamatban. A *hxnP* gén terméke egy transzporter, amely a 6-NA és valószínűleg a NA kis affinitású transzportere (Ámon, 2018). A *hxnZ* géntermék is transzporter molekula, azonban a gén delécioja nem mutatott semmilyen növekedésbeli változást NA-at, 6-NA-at, vagy 2,5-DP-t tartalmazó táptalajon, így ennek a funkciójára még tisztázásra vár (Ámon, 2018).

A prokarióta *P. putida* NA lebontási útvonalának egyik köztesterméke a 2,5-DP (Jimenez és mtsai., 2008). Az NDC1 klaszter elemzése során megvizsgáltuk, hogy az *A. nidulans* katabolizmusában szerepel-e a 2,5-DP. A vad típusú törzs képes volt növekedni 2,5-DP nitrogénforrást tartalmazó táptalajon, a HxnR transzkripció faktorra nézve delécio mutáns azonban nem (2. ábra) (Ámon és mtsai., 2017), tehát a 2,5-DP az *A. nidulans* lebontási

útvonalában is szereplő köztestermék. Ez az eredmény rávilágít arra, hogy az NDC1 klasztergének kívül más, szintén a HxnR transzkripció faktor szabályozása alatt álló gének még részt vesznek a lebontási folyamatban. Jelen értekezés témája az útvonal feltételezett további génjeinek azonosítása és jellemzése. Mivel az 1960-as és '70-es évek során mutagenezissel létrehozott NA-at nem hasznosító mutáns törzsek közül egy törzs (*hxn6* mutáns) mindmáig fennmaradt, amelyben a funkcióvesztésért felelős gén a genetikai keresztezések alapján a *hxnR* és *hxnS* lókuszoktól elkülönülten, de azok közelébe (kb. 40 kb távolságra) térképeződött (Joan Kelly személyes közlés), felbecsülhetetlen lehetőséget nyújtott számunkra, hogy megkezdjük az útvonalba részt vevő további gének azonosítását.



**2. ábra: Mutáns törzsek növekedési képessége különböző nitrogénforrásokon (Ámon és mtsai., 2017)**

Minden oszlop felett a vizsgált törzs releváns mutációja található. Hx: 1mM Hx nitrogénforrás. Hx, Allp: 1mM Hx nitrogénforrás 5,5 μM Allp-lal kiegészítve, ami gátolja a PHI (HxA) működését (viszont a HxnS-t nem). Hx, Allp, 100 μM NA: 1 mM Hx nitrogénforrás kiegészítve 5,5 μM Allp-lal és 100 μM NA-al; Hx, Allp, 100 μM 6-NA: 1 mM Hx nitrogénforrás kiegészítve 5,5 μM Allp-lal és 100 μM 6-NA-al. Hx, Allp, 100 μM 2,5-DP: 1 mM Hx nitrogénforrás kiegészítve 5,5 μM Allp-lal és 100 μM 2,5-DP-el, 10 mM NA, 10 mM 6-NA, 10 mM 2-5 DP: az egyedüli nitrogénforrás 10 mM NA, 6-NA, vagy 2,5-DP. A tenyészetek három napig 37° C-on voltak inkubálva, kivéve a \*-gal jelölt esetekben, ahol az inkubációs idő négy nap volt. Kontroll törzsek: szülői kontroll 1 (HZS.120), szülői kontroll 2 (TNO2 A21): az összes *hxn* gén tekintetében vad típusúak. Mutáns törzsek: *hxnS*Δ (HZS.548), *hxB20* (HZS.135), *hxnR*Δ (HZS.136), *hxnR80* (HZS.220), *hxnRc7* (FGSC A872). A felhasznált törzsek teljes genotípusa megtalálható az 1. mellékletben.

## 4. CÉLKITŰZÉS

A természetben számos mikroorganizmus képes a NA-at nitrogénforrásként hasznosítani, eddig mégis csak prokariótákban tanulmányozták a lebontás folyamatát. Eukariótákban ismeretlen a katabolizmus genetikai és molekuláris háttere, annak ellenére, hogy az *A. nidulans* modellszervezetről már az 1970-es években megállapították, hogy képes hasznosítani a NA-at egyedüli nitrogénforrásként, valamint számos NA-at hasznosítani nem képes mutánst izoláltak és vizsgáltak. Feltárták, hogy a lebontás első lépését, a NA 6-NA-vá történő átalakítását, a PHI xantin dehidrogenázzal vélhetően paralóg PHII enzim végzi. A NA-at nem hasznosító mutánsok között találtak regulátor-mutánsnak vélt törzseket is. A mutánsok klasszikus genetikai vizsgálatán túl azonban további tanulmányokat nem folytattak. Mivel az ezredfordulóra hozzáférhetővé vált számos modellorganizmus, így az *A. nidulans* genom szekvenciája is, új lehetőségek tárháza nyílt meg a NA hasznosítási út feltárásához. Kutatócsoportunk eukarióta szervezetben elsőként kezdett hozzá a NA katabolikus út tanulmányozásához. Azonosítottunk egy koregulációt mutató, hat génből álló génklasztert a VI. kromoszómán (NDC1), mely a PHII enzimet kódoló *hxnS* gént, a NA hasznosítás transzkripciós faktorának génjét, a *hxnR*-t, valamint két transzporter gént (*hxnP* és *hxnZ*) és két oxigenázt kódoló gént (*hxnT* és *hxnY*) hordozott. A *hxn* gének deléciójával létrehozott mutánsok NA hasznosítási vizsgálata olyan eredményekkel szolgált, amely világosan jelezte, hogy a NA lebontásában eddig még nem azonosított további gének is részt vesznek. Jelen értekezésben célunk a NA hasznosításban részt vevő további gének azonosítása, regulációjuk vizsgálata, deléciós mutánsok létrehozása és jellemzése. Ezen kívül célul tűztük ki, hogy a deléciós mutánsokkal végzett analitikai vizsgálatok segítségével elkezdjük az útvonal köztes metabolitjainak azonosítását.

Célkitűzéseink részletesen az alábbiak voltak:

- Az 1970-es években izolált *hxn6* mutáns törzs *A. nidulans* génbank transzformálásával célul tűztük ki további, NDC1 klaszteren kívüli, NA hasznosításban részt vevő gén(ek) azonosítását.
- Célul tűztük ki az azonosított új gén(ek) és a szomszédos gének regulációjának vizsgálatát kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) történő transzkriptum analízissel vad típusú törzsben és *hxnR* funkcióvesztéses mutánsban nem indukált és 6-NA-val indukált körülmények között. Az NDC1 génekkel mutatott koreguláció esetén a vizsgálat igazolja az új gén(ek) NA katabolikus útvonalhoz való tartozását, valamint a vizsgálat szomszédos génekre történő kiterjesztése lehetőséget nyújt egy új génklaszter azonosítására.

- A genom adatbázisokban elérhető gombagenomok összehasonlító *in silico* elemzésével vizsgálni kívántuk az NDC1 klaszter génjeinek és az új gén(ek) kromoszóma lokalizációs mintázatát (szinténia vizsgálat) evolúciós összefüggések feltárása céljából.

- Amennyiben az azonosított új gén(ek) regulációja összhangban van az NDC1 klaszter génjeivel, akkor a szóban forgó gén(ek) kiütésével deléciós mutáns(ok) előállítását terveztük, amely(ek) növekedési tesztjei bizonyíthatják, hogy a deletált gén(ek) terméke valóban a katabolikus útvonalban szerepel. A növekedési teszteket NA-at és a kereskedelembe forgalmazott származékait tartalmazó táptalajok bevonásával terveztük elvégezni.

- Mivel a *hxnTΔ* és *hxnYΔ* mutánsok növekedési tesztjei (Ámon, 2018) azt sugallták, hogy a NA lebontás nem egyetlen útvonalból áll, hanem alternatív útvonalak vesznek benne részt, célul tűztük ki *hxnS*, *hxnT* és *hxnY* génekre nézve dupla- és tripla deléciós mutánsok létrehozását és ezek nitrogénforrás hasznosítási képességének vizsgálatát. A halmozottan deléciós mutánsok a HxnT és HxnY útvonalban betöltött szerepének tisztázásához is hozzájárulnak majd.

- Célul tűztük ki, hogy mielőtt *in silico* fehérje elemzést végzünk, kísérletes úton meghatározzuk az újonnan azonosított gén(ek) cDNS szekvenciáját és összehasonlítjuk a génbank által feltételezett cDNS szekvenciával.

- Célul tűztük ki továbbá az új gén(ek) által kódolt fehérje(ék) lehetséges funkcióinak feltárását *in silico* elemzéssel.

- További célkitűzésünk annak felderítése volt, hogy a katabolikus útvonal milyen intracelluláris térben zajlik. Ezt a lebontási útvonal már ismert és újonnan azonosított további génjeinek zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) történő fúziójával és a fúziós fehérjét kifejező törzsek mikroszkópos vizsgálatával terveztük végrehajtani.

- Továbbá célul tűztük ki, hogy gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) és folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (HPLC-MS) analízist végzünk, melyekhez további deléciós törzseket hozunk létre. Az összes deléciós mutáns metabolitjainak elemzésével célunk a katabolikus útvonal köztes metabolitjainak meghatározása és végső soron a teljes lebontási útvonal megismerése.



## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1. Felhasznált mikroorganizmusok

A kísérletek során alkalmazott *A. nidulans* és *E. coli* törzsek listája az 1. és 2. mellékletben található meg.

### 5.2. Tenyésztési körülmények

#### 5.2.1. *A. nidulans* tenyésztésére felhasznált táptalajok

Minimál tápoldat (MM):

2% (v/v) sóoldat; 1% (m/v) glükóz; kísérletenként változó nitrogénforrás (pH 6,8)

Komplett tápoldat (CM):

2% (v/v) sóoldat; 1% (m/v) glükóz; 0,2% (m/v) pepton; 0,15% (m/v) kazamínosavak; 0,1% (m/v) élesztőkivonat (pH 6,8)

Szacharózos minimál tápoldat (SM):

2% (v/v) sóoldat; 1% (m/v) glükóz; 34,2% (m/v) szacharóz (pH 6,8)

Sóoldat:

26% (m/v) KCl; 26% (m/v)  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 76% (m/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5% (v/v) nyomelem-törzsoldat

Nyomelem-törzsoldat:

40 g/l Na-borát ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ); 400 mg/l  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 714 mg/l  $\text{FePO}_4$ ; 728 mg/l  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 800 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 8 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Vitaminok és felhasználási koncentrációjuk:

pantoténsav: 40 µg/l; para-amino-benzoesav: 40 µg/l; riboflavin: 50 µg/l; piridoxin: 25 µg/l; biotin: 0,1 µg/l; tiamin: 50 µg/l

Nitrogénforrások és felhasználási koncentrációjuk:

Hx: 1 mM; nátrium-nitrát: 10 mM; acetamid: 1 mM; urea: 5 mM; NA: 10 mM nitrogénforrásként és 100 µM, illetve 1 mM inducerként; 6-NA: 10 mM nitrogénforrásként és

100  $\mu$ M, illetve 1 mM inducerként; 2,5-DP: 10 mM nitrogénforrásként és 100  $\mu$ M, illetve 1 mM inducerként

Gátlószerek és felhasználási koncentrációjuk:

Allp: 5,5  $\mu$ M

#### 5.2.2. *Escherichia coli* tenyésztéséhez felhasznált táptalajok

Luria-Bertani (LB) tápoldat: 10 g/l tripton; 10 g/l NaCl; 5 g/l élesztőkivonat

Táptalajok esetében a tápoldatot 2% (m/v) agarral egészítettük ki. A transzformánsok szelektálásához és felszaporításához a tápoldatot, illetve a táptalajt 50  $\mu$ g/ml ampicillinnel is kiegészítettük.

#### 5.2.3. Az *A. nidulans* tenyésztési körülményei

A tápoldatot a táptalajok esetében 2,5% (m/v) agarral egészítettük ki. Szacharózos minimál táptalaj esetén 1% és 2,5% (m/v) agartartalmú táptalajt is alkalmaztunk. Az előbbi top agarként, az utóbbit normál tenyésztésre használtuk. Táptalajon történő növesztés során a felhasznált törzsekből 0,01% (v/v) Tween 80 oldatban konídium-szuszpenziót készítettünk, majd ezekből steril fogpiszkáló segítségével pontba oltottunk a táptalajra és 37 °C-on inkubáltunk. A nitrogénforrás nélküli, a Hx nitrogénforrást tartalmazó, az Allp-lal kiegészített Hx-t tartalmazó és az Allp-lal kiegészített Hx nitrogénforrás mellett alkalmazott NA, 6-NA, 2,5-DP illetve nikotinamid (NAA) inducert tartalmazó táptalajok esetében 3 napos, a NA-at, 6-NA-at, 2,5-DP-t, illetve NAA-ot nitrogénforrásként tartalmazó táptalajok esetében pedig 4 napos inkubációt alkalmaztunk. Folyadékkultúrák esetében  $10^8$  konídiumot oltottunk 300 ml MM tápoldatba és 37 °C-on 180 rpm rázatás mellett inkubáltuk 12 órán át.

### 5.3. Oldatok

#### 5.3.1. DNS izoláláshoz felhasznált oldatok

LETS puffer: 0,1 M LiCl; 0,01 M Na<sub>2</sub>EDTA; 0,2% (m/v) SDS; 0,01 M Tris-Cl; (pH 7,4)

PCI: fenol:kloroform:izoamil-alkohol, 25:24:1

#### 5.3.2. *E. coli* kompetens sejt gyártáshoz és transzformálásához felhasznált oldatok

SOB tápoldat: 2% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 10 mM NaCl; 2,5 mM kálium-klorid

(KCl), 10 mM magnézium-klorid (MgCl<sub>2</sub>); 10 mM magnézium-szulfát (Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O) (pH 6,7-7,0)

TB puffer: 10 mM PIPES; 15 mM kalcium-klorid; 250 mM KCl; 55 mM mangán-klorid; (pH 6,7)

GET oldat (100 ml): 2,5 ml 1M Tris (pH 7,5); 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8); 0,9 g glükóz

Alkalikus SDS oldat (100 ml): 88ml desztillált víz; 10 ml 20% SDS; 2 ml 10 M NaOH

High Salt oldat (100 ml, pH 4): 29,4 g kálium-acetát 60 ml desztillált vízben oldva; 11,5 ml jégecet; 28,5 ml desztillált víz

#### *5.3.3. Aspergillus transzformáláshoz felhasznált oldatok*

TN1 oldat: 5,22% (m/v) KCl; 0,735% (m/v) CaCl<sub>2</sub>

TN2 oldat: 60% (m/v) polietilén-glikol 4000 (PEG-4000); 1,214% (m/v) Tris; 0,735% (m/v) CaCl<sub>2</sub>

#### *5.3.4. Southern-blottoláshoz felhasznált oldatok*

Denaturáló puffer (500 ml): 10 g NaOH; 43,8 g NaCl

Neutralizáló puffer (500 ml): 125 ml 2M Tris (pH 7,5); 43,8 g NaCl; 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

20× SSC oldat (500 ml): 44,115 g Na-citrát; 87,66 g NaCl

#### *5.3.5. Southern-hibridizációhoz felhasznált oldatok*

A Dig-DNA Labeling and Detection Kit (Roche) felhasználásával, a gyártó leírása alapján készítettük el a felhasznált oldatokat.

#### *5.3.6. Horizontális gél elektroforézishez használt oldatok*

TAE futtatópuffer: 40 mM Tris; 20 mM ecetsav; 1 mM EDTA; (pH 7,5)

Felvivő puffer: 0,5% (m/v) SDS; 40% (m/v) szacharóz; 0,1% (m/v) brómfenolkék; 50 mM Tris; 10 mM EDTA; (pH 7,5)

#### *5.3.7. HPLC-MS mérésekhez használt oldatok*

„A” eluens: acetonitril/víz/100 mM ammónium-formát (pH 3,4), 50/40/10% (v/v)

„B” eluens: acetonitril/100 mM ammónium-formát (pH 3,4), 90/10% (v/v)

### **5.4. Kompetens *E. coli* sejtek készítése**

Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez egy telep *E. coli* JM109 (2. melléklet) inokulumot oltottunk 25 ml LB tápoldatba, majd 8 órán át 37 °C-on 250 rpm rázatással növesztettük. Az így felnövesztett kiindulási tenyészetből 15 ml-t 250 ml SOB tápoldatba oltottunk, majd 16 °C-on 175 rpm rázás mellett egy éjszakán keresztül növesztettük. Másnap, mikor a tenyészet a 0,7 OD<sub>600</sub> értéket elérte, a kultúrát 4 °C-on 5000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. A sejteket 80

ml TB pufferben felfuszpendáltuk, majd 8% dimetil-szulfoxidot (DMSO) adtunk hozzá. Az így elkészített szuszpenziót 50 µl-es adagokban, folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

### 5.5. Kompetens *E. coli* sejtek transzformálása

A kompetens *E. coli* JM109 (2. melléklet) sejtek transzformálását Maniatis és mtsai (Maniatis és mtsai, 1982) által leírtak alapján végeztük. A sejteket jégen kiolvasztottuk, majd a ligálási elegyet (7,5 µl) a mikrocentrifugacsőbe mértük a kiolvasztott kompetens sejtekhez, majd szuszpendáltuk és 25 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően az elegyet 2 percig hősokkoltuk 42 °C-on, majd a mintákat azonnal jégen hűtöttük. 800 µl LB-oldatot mértünk a mintákra és 45 percig 37 °C-on inkubáltunk. Az inkubáció letelte után 50 µl transzformáns elegyet szélesztettünk ampicillinnel kiegészített LB-táptalajra. A maradék tápoldatból a sejteket 5000 rpm-en történő 5 perces centrifugálással összegyűjtöttük, a felülúszót kiöntöttük. A visszamaradt folyadékban felfuszpendált sejteket egy másik, ampicillinnel kiegészített LB-táptalajra szélesztettük. A sejteket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk.

### 5.6. *Aspergillus* transzformálás

Az *A. nidulans* transzformálása Antal és mtsai (Antal és mtsai., 1997) alapján történt celofántenyészetten előállított (Ferenczy és mtsai., 1975, Kevei & Peberdy, 1977) protoplasztokkal. A protoplasztok képzéséhez komplett táptalajra helyezett celofánra leoltott törzs 16 órás tenyészetét használtuk. A leoltást ecsettel végeztük frissen gyűjtött, 0,01% (v/v) Tween 80-ban oldott konídiumszuszpenzióval. A protoplasztáláshoz 0,7 M KCl-oldatban feloldott Glucanex enzimkeveréket (Novozyme) használtunk, 40 mg/ml koncentrációban. A táptalajtól elválasztott celofánokat hármasával steril Petri-csészékbe helyeztük és 6-6 ml protoplasztáló folyadékot pipettáztunk rájuk. A protoplasztálást szobahőmérsékleten végeztük, maximum egy órán keresztül. A protoplasztokat 100 ml 0,7 M KCl oldatba mostuk le a celofánokról. A micéliális szennyeződéseket 100×100 µm rácsszerkezetű nylon szűrő segítségével távolítottuk el, majd a protoplasztokat centrifugálással (4000 rpm, 14 °C-on, 25 perc) gyűjtöttük össze. Ezt követően 10 ml 0,7 M KCl oldatba összemostuk a pelletet és újra centrifugáltuk. Ezt követően a protoplasztokat óvatosan felfuszpendáltuk 1 ml 0,7 M KCl oldatban. A szuszpenzióból 100-szoros hígítást készítettünk, amelynek protoplaszt-koncentrációját Bürker-kamrás számolással állapítottuk meg. Mikrocentrifugacsőbe mértünk  $5 \times 10^6$ , illetve  $5 \times 10^7$  sejtet, melyeket azután lecentrifugáltunk (2500 rpm, 6 perc), majd a pelletet 200 µl TN1 oldatban felfuszpendáltuk és hozzáadagoltunk 1-10 µg DNS-t és 55 µl TN2

oldatot. Az elegyet 30 percen át jégen inkubáltuk, majd 1 ml TN2-t mértünk az elegyhez, és 5 percen át szobahőmérsékleten tartottuk. Ezt követően 10 ml 0,7 M KCl-oldatot adtunk hozzá mosás céljából és centrifugáltuk (4000 rpm, 20 perc) a protoplasztokat, hogy a toxikus PEG-tartalmat eltávolítsuk. A pelletet 1 ml 0,7 M KCl oldatba szuszpendáltuk és 50 ml 40 °C-os 1% (m/v) SM top agarral kevertük, majd 10 db SM táptalajt tartalmazó csészére szétterítettük. A protoplasztokat 37 °C-on regeneráltattuk. Csak azok a protoplasztok tudtak telepet képezni, melyekben a genomba rekombináladott konstrukción hordozott szelekciós marker gén (pl. *riboB*<sup>+</sup>) kifejeződött és komplementálta az adott (pl. riboflavin) auxotrófiát.

### **5.7. *A. nidulans* törzsek létrehozása keresztezéssel**

Megfelelő genotípussal rendelkező *A. nidulans* törzsek létrehozásához keresztezést alkalmaztunk. Olyan törzseket használtunk, melyek minden esetben legalább egy auxotrófiát okozó mutációt hordoztak, de a keresztezett törzsek egy esetben sem rendelkeztek ugyanazzal a mutációval, így heterokarion képzése során képesek komplementálni egymás auxotrófiáit. A keresztezni kívánt törzseket először sakktábla-szerű mintázatban CM táptalajra oltottuk, majd az összenőtt telepszélekből steril lándzsátű segítségével 4-4 agarkockát vágunk ki, amit fejfelé MM táptalajra helyeztünk át, ahol az auxotróf törzsek önmagukban nem képesek növekedni, de a hifaanasztomózissal (gombafonalak fúziója) létrejövő hetekarionok igen. Három napig 37 °C-on inkubáltuk a telepeket, majd cellux segítségével oxigénmentesen lezártuk a Petri-csészéket, így teremtve meg a megfelelő körülményeket a szexuális életciklus számára. Ezt követően további 10-14 napig 37 °C-on inkubáltuk a csészéket a szexuális szaporítóképletek (kleisztotéciumok) megjelenéséig. Keresztezésenként nyolc darab kleisztotéciumot gyűjtöttünk, melyeket MM táptalaj felszínén megtisztítottunk a ráragadt hifáktól, micélumoktól, illetve Hülle sejtektől, majd egyenként 200-200 µl 0,01% (v/v) Tween 80 oldatba helyeztük őket. A mikrocentrifuga cső falához nyomva széttörtük a kleisztotéciumokat, így az askospórák kiszabadulhattak a folyadékba. Annak megállapítására, hogy szülői, vagy rekombináns kleisztotéciumokat gyűjtöttünk-e, az askospóra szuszpenziókból 5-5 µl-t szélesztettünk MM táptalaj felszínére, amely semmilyen vitamint nem tartalmazott, így csak a rekombinációval létrejövő prototróf utódok voltak képesek telepet képezni. A megfelelő askospóra szuszpenziók közül kiválasztottunk egyet, melyből 200-szoros hígítást készítettünk, majd ebből 30, 40, illetve 50 µl mennyiségüket CM táptalajra szélesztettünk steril üvegbot segítségével. Két nap, 37 °C inkubációt követően

spóraszuszpenziókat készítettünk az egyedi telepekből és különböző összetételű táptalajra oltottuk őket a pontos genotípusok megállapításának céljából.

## **5.8. Nukleinsav-manipulációhoz felhasznált módszerek**

### *5.8.1. Totál DNS kivonás *A. nidulans*-ból*

A komplett táptalajon felnövesztett *A. nidulans* törzsekből  $10^8$  konídiumot oltottunk 100 ml, vitaminoldattal kiegészített folyékony MM tápoldatba, majd egy éjszakán át neveltük a törzseket. Az ezekből nyert micéliumtömeget szűrővel gyűjtöttük össze és folyékony nitrogénben történő fagyasztást követően kerámiamozsárban nitrogén alatt eldörzsöltük. Az eldörzsölt micéliumból kb. 0,1 g mennyiséget 0,8 ml LETS pufferrel, majd 0,8 ml PCI-vel mikrocentrifugacsőben vortexeltük, majd 13000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. A vizes fázist átmértük új mikrocentrifugacsőbe, majd azonos mennyiségű kloroform-izoamil-alkohollal (24:1) vortexeltük és 13000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. A vizes fázishoz egy újabb mikrocentrifugacsőben 10% (v/v) 3 M Na-acetátot, illetve ekvivalens térfogatnyi izopropanolt mértünk, majd  $-20^{\circ}\text{C}$ -on legalább 1 óráig inkubáltuk. Centrifugálás és 70% (v/v) etanollal történő mosás után a DNS pelletre desztillált vízzel hígított RNáz-oldatot ( $0,05\text{ }\mu\text{g/ml}$ , Sigma Aldrich) mértünk és fél órán keresztül  $37^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. Az RNS-szennyeződés eltávolítását követően az izolált DNS-t  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### *5.8.2. RNS kivonás *A. nidulans*-ból, cDNS szintézis*

Az RNS-tartalom izolálásához a szűrt és szárazra csavart micéliumot folyékony nitrogén alatt, kerámiamozsárban púderfinomságúra dörzsöltük. Az RNS kivonáshoz az RNeasy Plus Mini Kit-et (Qiagen) használtuk a gyártó utasításai szerint. Egy-egy kivonáshoz kb. 100 mg biomasszát használtunk fel. Az izolált RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) berendezéssel ellenőriztük. A cDNS-szálakat a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) segítségével szintetizáltuk, a gyártó instrukciói alapján. A cDNS szintéziséhez  $1\text{ }\mu\text{g}$  templát RNS-t, valamint oligo-dT és random indítószekvenciák 1:1 arányú keverékét használtuk.

### 5.8.3. Plazmid minipreparátumok készítése *E. coli*-ból

A transzformált *E. coli* JM109 (2. melléklet) egyedi kolóniák sejtjeit 37 °C-on egy éjszakán át tenyésztettük 2 ml, 50 µg/ml ampicillinnel kiegészített LB tápoldatban. A tenyészetet mikrocentrifugacsövekbe mértük és a sejteket 5000 rpm-en történő 5 perces centrifugálással üleptítettük. A fellazított pellethez 0,1 ml GET oldatot pipettáztunk, majd homogénre vortexeltük. Ezt követően 0,2 ml alkalikus SDS-sel feltártuk a sejteket. A mikrocentrifugacsöveket a folyadék feltisztulásáig óvatos forgatással elegyítettük. Ezután 0,15 ml High Salt oldatot mértünk a csövekbe, melyeket ismét forgatással elegyítettünk a fehérje és lipid komponensek kicsapódása következtében keletkezett fehér csapadék megjelenéséig. 10 perc 13000 rpm-en végzett centrifugálás után a felülúszóhoz 1:1 arányban kloroform-izoamil-alkohol (24:1) oldatot adtunk, melyet újabb 10 perc 13000 rpm-en történő centrifugálás követett. A vizes fázisból a plazmid DNS-t megegyező mennyiségű izopropanol hozzáadásával precipitáltuk, melynek a hatékonyságát 1 óra -20°C-os inkubálással növeltük. Ezután centrifugálás és 70% (v/v) etanollal történő mosás következett, majd a DNS pelletet nyitott tetővel szobahőmérsékleten szárítottuk. A beszárított mintákat 50 µl RN-áz (10 µg/ml, Sigma Aldrich) tartalmú desztillált vízben vettük fel, majd a megfelelő restrikciós enzimekkel történő 1,5 órás emésztést követően 0,8%-os agaróz gélen futtatva ellenőriztünk.

### 5.8.4. DNS-minták agaróz gélelektroforézise

A DNS-minták méret szerinti elválasztását agaróz gélelektroforézissel végeztük. Az eljáráshoz 0,8% (m/v) agaróz gél és TAE futtatópuffert használtunk. A DNS láthatóvá tétele érdekében a gélhez 5 µg/ml etídium-bromidot adtunk. A mintákhoz a futtatás előtt 1/5 térfogatnyi felvivő puffert mértünk. Az elektroforézist 100 V állandó feszültségen végeztük.

### 5.8.5. DNS visszanyerése agaróz gélből

A gélelektroforézist követően a DNS-t tartalmazó sávokat UV fénnel vizualizáltuk és szike segítségével kivágtuk. A DNS-t a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) felhasználásával tisztítottuk az agaróz gélből a gyártó utasításai alapján.

### 5.8.6. DNS emésztése restrikciós endonukleázokkal

A DNS-minták emésztéséhez restrikciós endonukleázokat (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításai szerint.

### 5.8.7. DNS-molekulák ligálása

A DNS-ligálást T4 ligáz enzimmal végeztük (Thermo Scientific) a gyártó utasításai alapján. A vektor:inszert arányt tompa vég esetén 1:8-ra, azonos ragadós vég esetén 1:4-re,

különböző ragados végek esetén pedig 1:1 aránytól 1:4 arányig tetszőleges mértékűre állítottuk be. A ligálást 20 °C-on végeztük 5-14 órán keresztül.

#### 5.8.8. Polimeráz láncreakció (PCR)

PCR-hez a PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene) enzimet használtuk a gyártó utasításai szerint. Egy reakció 50 µl végtérfogatban 1-100 ng templát DNS-t és 20-20 pmol forward és reverz indítószekvenciákat tartalmazott. A PCR során a következő körülményeket alkalmaztuk: 98 °C 30 másodperc elődenaturáció, 34 cikluson keresztül 98 °C 10 másodperc denaturáció, 58 °C 30 másodperc indítószekvencia kötődés és 72 °C 30 másodperc/kb polimerizáció, végül pedig 72 °C 5-10 perc utópolimerizáció.

#### 5.8.9. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

Az 5.8.2. alfejezetben leírtak alapján létrehozott cDNS-minták RT-qPCR analízisét CFX96 Real Time PCR System (Biorad) berendezés és SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific) reakcióelegy felhasználásával végeztük. A reakció első lépése egy 94 °C-os, 3 perces elődenaturáció, majd ezt követi 40 ciklus az alábbi paraméterekkel: 94 °C 15 másodperc, 60 °C 60 másodperc. Az adatok kiértékelése a „relative standard curve” eljárással (Larionov és mtsai., 2005) történt. Minden mérés legalább 3 technikai párhuzamossal történt.

#### 5.8.10. Southern-hibridizáció

A restrikciós endonukleázokkal megemésztett (5.8.6. alfejezet) 5-10 µg DNS-mintákat agaróz gélelektroforézissel választottuk el (5.8.4. alfejezet), majd kapilláris módszerrel (Maniatis és mtsai., 1982) Hybond N membránra (GE Healthcare) blottoltuk. A jelölt próbák készítését és a detektálást a DIG DNA Labeling and Detection Kit-el (Roche) végeztük a gyártó utasításai alapján.

### 5.9. A *hxnV* és *hxnW* cDNS szekvenciák felsokszorozása

A *hxnV* és *hxnW* gének cDNS szekvenciájának ellenőrzéséhez vad típusú *A. nidulans* törzs (HZS.145) cDNS-ét alkalmazva sokszoroztuk fel a *hxnV* és *hxnW* gének szekvenciáját PCR segítségével. A *hxnV* cDNS szekvenciájának esetében a „*hxnV* cDNA UJ EcoRI frw” és „*hxnV* cDNA PstI rev”, a *hxnW* cDNS szekvenciájának esetében pedig a „*hxnW* ispan frw” és „*hxnW* 3 UTR rev” indítószekvenciákat alkalmaztuk (4. melléklet).



### 5.10. A szubsztitúciós kazetták létrehozása a *hxnS*, *hxnS/hxnT*, *hxnV*, *hxnX*, *hxnW*, *hxnM* és *hxnN* gének deléciójához

A deléciós mutánsokat a „Double Joint PCR” módszer (Yu és mtsai., 2004) segítségével hoztuk létre három komponensű („A”, „B” és „C”) deléciós kazetták készítésével (3. ábra). PCR segítségével felszaporítottuk az alábbi komponenseket:

„A” komponens: a deletálni kívánt géntől upstream elhelyezkedő, kb. 3 kb hosszúságú szekvencia (3. ábra). Az alkalmazott indítószekvenciák (4. melléklet) a következők voltak:

- *hxnS* és *hxnShxnT*: „hxnS rup frw” és „hxnS rup rev”
- *hxnV*, *hxnWhxnV* és *hxnXhxnWhxnV*: „hxnV upst frw” és „hxnV upst rev”
- *hxnX*: „hxnV AS frw” és „hxnV down nest rev”
- *hxnW*: „hxnW upst frw” és „hxnW upst rev”
- *hxnM*: „hxnM upst frw” és „hxnM upst rev”
- *hxnN*: „hxnN upst frw” és „hxnN upst rev”

„B” komponens: a transzformáláshoz használatos vad típusú marker gén, mely komplementálja a recipiens törzs valamely auxotrófiáját (3. ábra). A marker gén amplifikálására speciális kiméra primereket használunk: a forward primer 5' vége komplementer az upstream szekvencia nem kódoló szálának 3' végével, a reverse primer 3' vége pedig a downstream szekvencia kódoló szálának 5' végével. Az alkalmazott indítószekvenciák (4. melléklet) a következők voltak:

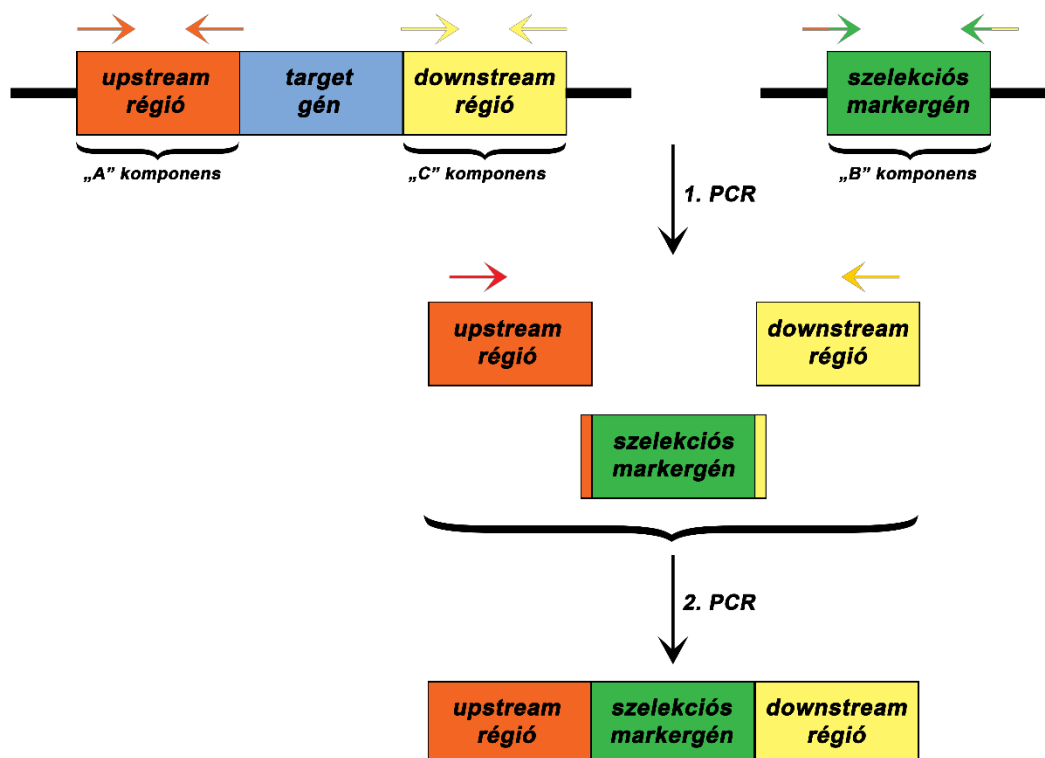
- *hxnS*: „hxnS rpaba kim frw” és „hxnS rpaba kim rev”
- *hxnShxnT*: „hxnS rpaba kim frw” és „hxnT paba kim rev”
- *hxnV*: „hxnV ribokim frw” és „hxnV ribokim rev”
- *hxnX*: „hxnX ribokim frw” és „hxnX ribokim rev”
- *hxnW*: „hxnW ribokim frw” és „hxnW ribokim rev”
- *hxnM*: „hxnM ribokim frw” és „hxnM ribokim rev”
- *hxnN*: „hxnN ribokim frw” és „hxnN ribokim rev”
- *hxnWhxnV*: „hxnV ribokim frw” és „hxnW ribokim rev”
- *hxnXhxnWhxnV*: „hxnV ribokim frw” és „hxnX ribokim rev”

„C” komponens: a deletálni kívánt géntől downstream elhelyezkedő, kb. 3 kb hosszúságú szekvencia (3. ábra). Az alkalmazott indítószekvenciák (4. melléklet) a következők voltak:

- *hxnS*: „hxnS rdown frw” és „hxnS rdown rev”
- *hxnShxnT*: „hxnT down frw” és „hxnT down rev”
- *hxnV*: „hxnV down frw” és „hxnV down rev”
- a *hxnX* és *hxnXhxnWhxnV*: „hxnX down frw” és „hxnX down rev”
- *hxnW* és *hxnWhxnV*: „hxnW down frw” és „hxnW down rev”
- *hxnM*: „hxnM down frw” és „hxnM down rev”
- *hxnN*: „hxnN down frw” és „hxnN down rev”

A létrehozott „A”, „B” és „C” komponenseket Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) segítségével megtisztítottuk a reakcióelegyben maradt indítószekvenciáktól, az enzimektől és a sóktól. A komponenseket egy újabb PCR-rel szereltük össze az „A”, „B” és „C” komponenseket 1:2:1 arányban használva templátként (3. ábra). Az alkalmazott indítószekvenciák (4. melléklet) a következők voltak:

- *hxnS*: „hxnS rup nest frw” és „hxnT rev”
- *hxnShxnT*: „hxnS rup nest frw” és „hxnT down nest rev”
- *hxnV*: „hxnV upst nest frw” és „hxnV down nest rev”
- *hxnX*: „hxnX upst nest frw” és „hxnW down rev”
- *hxnW*: „hxnV AS frw” és „hxnW down nest rev”
- *hxnM*: „hxnM upst nest frw” és „hxnM down nest rev”
- *hxnN*: „hxnN upst nest frw” és „hxnN down nest rev”
- *hxnWhxnV*: „hxnV upst nest frw” és „hxnW down nest rev”
- *hxnXhxnWhxnV*: „hxnV upst nest frw” és „hxnW down rev”



**3. ábra: A szubsztitúciós kazetták elkészítésének sematikus ábrája.**

Narancssárga téglalap (HR1): a deletálni kívánt géntől upstream található szekvencia, a szubsztitúciós kazetta "A" komponense; amplifikációja "upstream frw" és "upstream rev" indítószekvencia párokkal történt (narancssárga nyilak). Kék téglalap: a deletálni kívánt gén szekvenciája. Sárga téglalap (HR2): a deletálni kívánt géntől downstream irányban található szekvencia, a szubsztitúciós kazetta "C" komponense, amelyet a "downstream frw"- "downstream rev" indítószekvencia párok használatával készítettünk el (sárga nyilak). Zöld téglalap: szelekciót biztosító vitamin auxotrófia marker gén szekvenciája, a szubsztitúciós kazetta "B" komponense; elkészítése olyan specifikus indítószekvenciákkal történt, amelyek egyik része a deletálni kívánt gén upstream (narancssárga-zöld nyíl narancssárga része) vagy downstream (zöld-sárga nyíl sárga része) szekvenciájával, másik része pedig a szelekciós marker gén szekvenciájával homológ (nyíl zöld része). A 3 komponens összeépítése a "nested upstream frw"(piros nyíl) és "nested upstream rev" (arancssárga nyíl) indítószekvenciákkal történt.

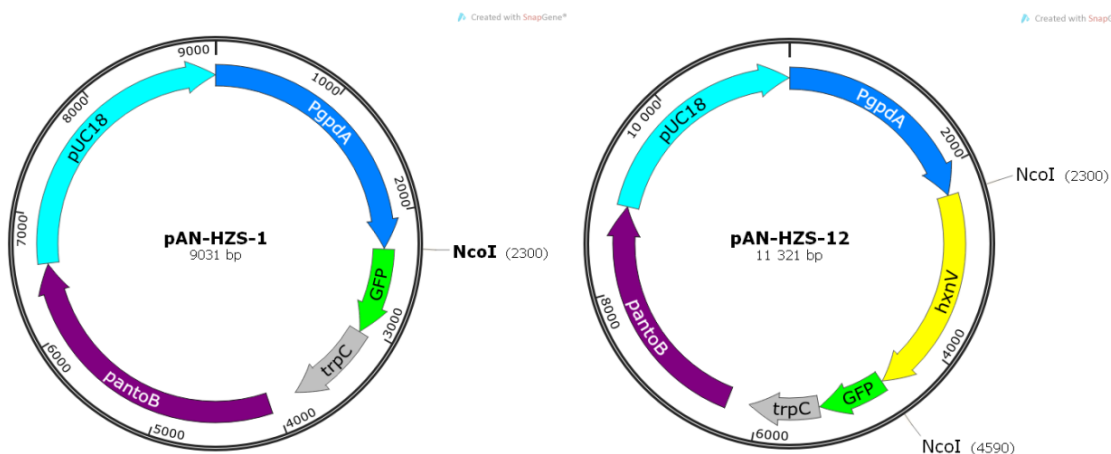
Az összeszerelés sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a terméket további tisztítás nélkül használtuk fel transzformáláshoz.

## 5.11. GFP-fúziós konstrukciók létrehozása

### 5.11.1. A *hxnV-gfp-t* (C-terminális GFP-fúziós fehérjét) kódoló konstrukció létrehozása

A GFP-fúziós konstrukció létrehozásához a pAN-HZS-1 (4. ábra, 3/A melléklet) plazmidot használtuk fel. A vektor tartalmazza a *pantoB* vad típusú szelekciós marker gént, mely a recipiens törzs *pantoB100* mutációját képes komplementálni, ezáltal megszüntetni a törzs pantoténsav auxotrófiáját. Emellett tartalmazza a *gpdA* promóter után illesztett GFP-t

kódoló szekvenciát és a *trpC* gén terminációs szekvenciáját. A HxnV-GFP fúziós fehérje létrehozásához genomi templátról felszaporítottuk az adott gén szekvenciáját („hxnV NcoI frw” és „hxnV GFP linker NcoI rev” indítószekvenciák, 4. melléklet). A PCR-termék mindkét végén egy-egy NcoI hasítóhelyet hordozott, nem tartalmazta a stop kodont, viszont tartalmazott egy 9 AS hosszúságú „linker” peptid szekvenciát (LIDTVDLDS). Az így létrehozott szekvenciát a pAN-HZS-1 vektor NcoI hasítóhelyére klónoztuk megfelelő orientációba, létrehozva a pAN-HZS-12 vektort, melyet azután transzformációra használtunk fel (4. ábra, 3/A melléklet).

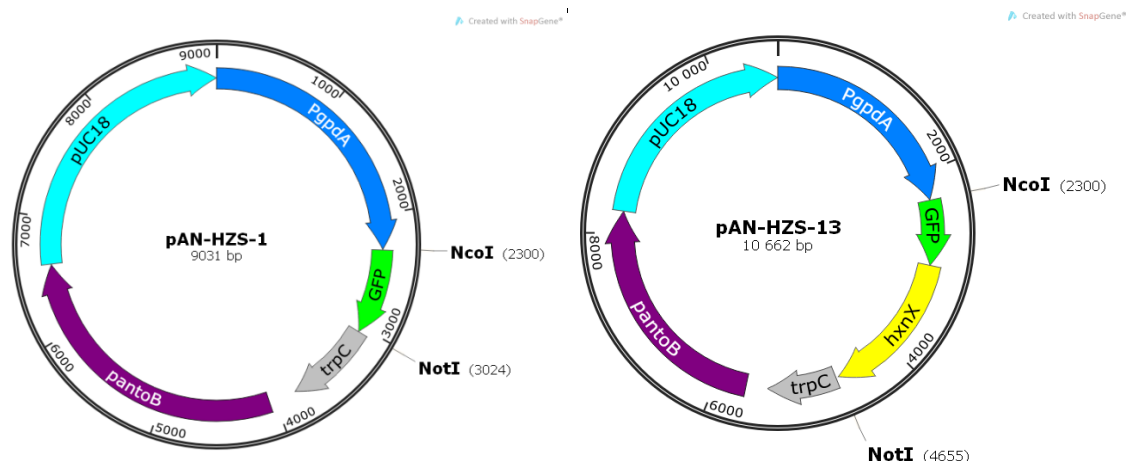


**4. ábra: A *hxnV-gfp*-t kifejező konstrukcióhoz létrehozott pAN-HZS-12 vektor.**

Bal oldalon látható a pAN-HZS-1 vektor, melynek NcoI hasítóhelyeire beklónoztuk a *hxnV* szekvenciát, jobb oldalon pedig a kész pAN-HZS-12 vektor. Világoskék: *E. coli* replikációs origó, sötétkék: *PgpdA* promóter, sárga: NcoI hasítóhelyek közé klónozott *hxnV* gént kódoló szekvencia, zöld: zöld fluoreszcens fehérjét kódoló szekvencia, szürke: *trpC* terminális szekvencia, lila: *pantoB* szelekciós marker gén.

#### 5.11.2. A *gfp-hxnX*-et (*N*-terminális GFP-fúziós fehérjét) kódoló konstrukció létrehozása

Felszaporítottuk a *gfp* szekvenciát az előző pontban bemutatott pAN-HZS-1 (5. ábra, 3/A melléklet) vektorról úgy, hogy a szekvencia ne tartalmazza a stop kodont („1pGpd int frw” és „10GFP linker hmgB rev” indítószekvenciák, 4. melléklet). A HZS.145 törzs DNS-kivonatát használva templátként felszaporítottuk a *hxnX* gént („linker kim hxnX frw” és „hxnW down nest rev” indítószekvenciák, 4. melléklet). Mindkét PCR-termék tartalmazott egy 24 bázispár (bp) hosszúságú, átfedő szekvenciát, mely a fúzió létrehozásához szükséges, és tartalmaz egy 8 AS hosszúságú linker szekvenciát (LIDTVDL) a fuzionált fehérjék közt. A két terméket PCR segítségével fuzionáltattuk („5GFP NcoI start frw” és „hxnX NotI rev” indítószekvenciák, 4. melléklet). A fúziós terméket NcoI és NotI restriktációs endonukleázokkal emésztettük és NcoI/NotI hasítóhelyekre klónoztuk pAN-HZS-1 vektorba. A létrehozott konstrukciót a továbbiakban pAN-HZS-13-nak neveztük (5. ábra, 3/A melléklet), melyet később transzformációra használtunk fel.



**5. ábra: A *gfp-hxnX*-et kifejező konstrukcióhoz létrehozott pAN-HZS-13 vektor.**

Bal oldalon látható a pAN-HZS-1 vektor, melynek NcoI/NotI hasítóhelyei közé beklónoztuk a *hxnX* szekvenciát, jobb oldalon pedig a kész pAN-HZS-13 vektor. Világoskék: *E. coli* replikációs origó, sötétkék: *Pgpda* promóter, sárga: NcoI/NotI hasítóhelyek közé klónozott *hxnX* gént kódoló szekvencia, zöld: zöld fluoreszcens fehérjét kódoló szekvencia, szürke: *trpC* terminális szekvencia, lila: *pantoB* szelekciós marker gén.

## 5.12. *In silico* analízis

### 5.12.1. Ortológ keresés

Az ortológ fehérjék keresésére a JGI Fungal Genome Portal adatbázisban (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) hozzáférhető több száz gombagenomot használtuk, ortológ keresés funkciót és az alapbeállításokat alkalmazva.

### 5.12.2. Lokalizációs szignál keresés

A lokalizációs szignál szekvenciák keresését a <https://wolfsort.hgc.jp/> szerver segítségével végeztük. A <http://www.aspgd.org> adatbázisból kigyűjtött fehérje szekvenciákat használtuk fel a lokalizációs szignálok keresése során.

### 5.12.3. Homológia keresés

A BLAST analíziseket a fehérjék szekvenciájának betáplálásával végeztük a <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (blastp) program segítségével baktérium- és gomba genomok (kizárva az *Aspergillaceae* családot) közti kereséssel, az alapbeállításokat alkalmazva.

A PHYRE analízisek esetében is a fehérjék szekvenciáit adtuk meg és a <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> programot használtuk a funkcionális homológok kereséséhez, az alapbeállításokat alkalmazva.

### 5.13. Mintaelőkészítés a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz

A mikroszkópos preparátumok készítéséhez  $10^4$  konídiumot oltottunk MM tápoldatba süllyesztett fedőlemez felületére és 37 °C-on inkubáltuk 16-20 órán keresztül. A preparátumokban a GFP és RFP (vörös fluoreszcens fehérjével) fehérjét Zeiss Axiolab A fluoreszcens mikroszkóp „Zeiss szűrő szett 15” és „Zeiss szűrő szett 09” szűrők felhasználásával vizsgáltuk.

### 5.14. Mintaelőkészítés és extrakció GC-MS és HPLC-MS analízishez

A felnövesztett telepek konídiospóráit 0,01% (v/v) Tween 80 oldatba gyűjtöttük Petri-csészében növesztett három napos telepekről, majd acetamiddal és vitaminokkal kiegészített MM tápoldatba oltottuk és 37 °C-on 24 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után szűrtük és mostuk a tenyészeteket, majd 10 mM NA, vagy 6-NA nitrogénforrást tartalmazó MM tápoldatban további 16 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően a micéliumokat szűréssel összegyűjtöttük. A fagyasztva szárított, majd elporított micéliumokból 20 mg mennyiséget Eppendorf-csőbe mértünk és hozzáadtunk 1 ml, 4 °C hőmérsékletű metanol/víz, 80/20% (v/v) oldószerkeletet. Az extrakciót 4 °C-on hajtottuk végre, 5 perc ultrahangos kezelés és az azt követő 1 perc vortexelés segítségével, mely lépéssorozatot háromszor ismételtünk. A mintákat centrifugáltuk (13000 rpm, 5 perc, 4°C), majd a felülúszó összetételét vizsgáltuk GC-MS és HPLC-MS módszerekkel.

### 5.15. Mérési körülmények GC-MS analízis esetén

A nyers extraktumokból 200 µl-t nitrogén áram alatt lepároltunk. A száraz maradékot 75 µl piridinben oldottuk, majd hozzáadtunk 75 µl N-metil-N-(terc-butil-dimetil-szilil)-trifluor-acetamidot. Az elegyet 5 perc ultrahangos kezelést (Típus: 656, MTA KUTESZ, Magyarország) követően 30 percig 65 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A fél óra származékképzési reakció után a szobahőmérsékletre hűtött reakcióelegyből 1 µl térfogatot injektáltunk a GC-MS rendszerbe. A GC-MS analízist Agilent 6890N gázkromatográf-fal kapcsolt Agilent 5973N tömegspektrométerrel hajtottuk végre (Agilent Technologies, USA). A GC-MS vizsgálat mérési körülményei a következők voltak: kapilláris oszlop: HP-5MS (30 m x 0,250 mm x 0.25 µm); injektor hőmérséklete: 250 °C; injektált mennyiség: 1 µl; vivőgáz: He (1 ml/perc); hőmérsékletprogram: 70 °C, 2 perc → 3,5 °C/perc, 215 °C, 15 perc → 3,5 °C/perc, 250 °C, 0 perc → 20 °C/perc, 300 °C, 5 perc; tömegtartomány: 40 – 700 Da; analizátor hőmérséklete: 150 °C; ionforrás hőmérséklete: 230 °C.

### 5.16. Mérési körülmények HPLC-MS analízis esetén

A nyers extraktumok HPLC-MS analízisét egy dimer pumpával, gázmentesítő egységgel, UV detektorral, oszlop termosztáttal és automata mintaadagolóval felszerelt Dionex Ultimate 3000 UHPLC rendszerhez (Thermo Scientific, USA) kapcsolt hibrid kvadrupól-Orbitrap Q Exactive Plus tömegspektrométerrel végeztük (Thermo Scientific, Germany). Az 5 µl minták elválasztását 25 °C-on termosztált, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm szemcseátmérőjű LUNA-HILIC (Phenomenex) oszlopon, grádiens eluensárammal valósítottuk meg 0,7 ml/perc áramlási sebességgel. Az „A” eluens acetonitril/víz/100 mM ammónium-formát (pH 3,4), 50/40/10% (v/v) arányú elegye, míg a „B” eluens acetonitril/ammónium-formát (pH 3,4), 90/10% (v/v) arányú elegye volt. A grádiensprogramot 4 percig tartó 95% „B” eluens tartalommal indítottuk, mely 3 perc alatt 50%-ra csökkent. Ezt követően a mozgófázis összetételét 4 percen keresztül ezen az értéken tartottuk, majd további 1 perc alatt visszaállítottuk a kiindulási értékre és a nyomás stabilizálódásáig (8 perc) ezen az értéken hagytuk. A mintákból 5 µl-t injektáltunk a HPLC-MS rendszerbe. A nyers extraktumok HPLC-UV analízise során a minták UV-elnyelését 260, és 330 nm hullámhosszon követtük. A tömegspektrométer irányítását és az adatgyűjtést az Xcalibur™ 2.2.1, az eredmények kiértékelését és a főkomponens analízist pedig a Compound Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific) szoftverekkel végeztük. A tömegspektrométer beállításai a következők voltak: ionforrás: HESI; ionizáció: pozitív mód; spray feszültség: 3500 V; porlasztógáz áramlási sebessége: 40 (tetszőleges egység); szárítógáz áramlási sebessége: 65 (tetszőleges egység); kapilláris hőmérséklet: 350 °C; S lencsék rádiófrekvenciás beállítása: 50 V; felbontás: 70000. A tömegspektrometriás mérések full scan-ddms2 módban történtek. A vegyületeket az 50-500 Da tömegtartományban detektáltuk és a kromatográfiás csúcsokban a legintenzívebb 5 protonált molekulaion fragmentációját hajtottuk végre.

## 6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 6.1. Az NDC1 klasztergéneken kívül további, nikotinsav lebontásban szerepet játszó gének keresése

Az 1970-es években a NA-at nitrogénforrásként nem hasznosító mutánsokon végzett klasszikus genetikai vizsgálatok világosan jelezték, hogy léteznek olyan allélok, amelyek vagy laza kapcsolatban állnak az általunk azonosított NDC klaszter (NDC1) génjeivel, vagy nem mutatnak kapcsoltságot velük (J. Kelly és C. Scazzocchio személyes közlése). Mivel a szóban forgó mutánsok közül egyetlen törzs, a *hxn6* mutáns (CS308) fennmaradt (C. Scazzocchio személyes törzsgyűjteményében), lehetőségünk nyílt arra, hogy génbank transzformálás útján azonosítsuk a *hxn6* allélt, majd vizsgáljuk a *hxn6* allél vad típusú gén és a szomszédos gének expresszióját annak reményében, hogy az NDC1 génjeivel koregulációt mutató gén(ek)re találunk. Ezen kívül *in silico* elemzéssel az azonosított gén(ek) és az NDC1 klaszter génjeinek egymáshoz viszonyított lokalizációjának konzerváltságát (szinténia vizsgálat) is vizsgálni kívántuk, amely a nikotinsav katabolikus út evolválódásáról nyújthat információt.

#### 6.1.1. *In vivo* megközelítés – *hxn6* mutáns transzformálása *A. nidulans* génbankkal, a *hxn6* mutáció azonosítása és az NDC2 génklaszter felfedezése

Az 1970-es évekből fennmaradt *hxn6* törzs (CS308) olyan NA-at nem hasznosító mutáns volt, amelyben a mutáns allél a klasszikus genetikai elemzések alapján nem az NDC1 klasztergénekhez térképeződött a genomban, hanem azoktól nagyjából 40 kb távolságra (Joan Kelly személyes közlés). A *hxn6* törzs azért volt rendkívül fontos a NA katabolizmus vizsgálata számára, mert nem képes hasznosítani sem a NA-at, sem pedig a 6-NA-at. Ilyen jellegű fenotípust korábban csak a *hxnR* transzkripciósfaktor funkcióvesztéses mutációja, vagy deléciónja esetében tapasztaltunk. Ezek alapján úgy gondoltuk, hogy a *hxn6* allél vad típusú megfelelője a NA katabolizmus esszenciális komponensét kódolhatja. A *hxn6* allél azonosításához a CS308 törzsbe genetikai keresztezéssel (CS308×H.ZS.125) *pyrG89* mutációt vittünk be, hogy lehetőségünk legyen a *pyr4* (a *pyrG*<sup>+</sup> gén megfelelője *Neurospora crassa*-ban) szelekciós marker gént tartalmazó génbank vektorok transzformációval történő bejutásának szelekciójára. A génbank plazmid szerkezetének bemutatása a 3/B mellékletben található.

A *hxn6 pyrG89* törzset (H.ZS.257) 5 µg *A. nidulans* génbank DNS-el (Oshero & May, 2000) transzformáltuk, majd a transzformánsokat 6-NA nitrogénforrást igen (csak *hxn6*-ot szupresszáló transzformánsok nőhetnek), de uracilt és uridint nem tartalmazó táptalajon (szelektáltunk a *pyr4*-t kifejező transzformánsokra) növesztettük. Egyetlen transzformáns



telepet izoláltunk, amelyen plazmid menekítést hajtottunk végre totál DNS kivonást (5.8.1. alfejezet) követően a totál DNS *E. coli* JM109 törzsébe (2. melléklet) történő transzformálásával (5.5. alfejezet). A kapott *E. coli* transzformáns törzsek közül négy telepből készítettük plazmid minipreparátumot (5.8.3. alfejezet), amelyek BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, XbaI, és XhoI restrikciós profilja megegyező volt (nem mutatott adat). Az egyik plazmid preparátumból létrehozott HindIII szubklónok (pBluescript SK plazmidba) T3, T7, és „walking” indítószekvenciákkal (4. melléklet) történő szekvenálásával (LGC Genomics) azonosítottuk azt a genomi régiót, amely a *hxn6* allélt komplementálta (6. ábra). Az eredmények alapján a génbank plazmid egy 8256 bp-os genomi DNS-t hordozott, amely az 5' és a 3' végén részlegesen hordozta az AN9159 és az AN9162 gént, köztük pedig 3 teljes ORF-et találtunk, az AN11187-et, az AN11172-t és az AN9161-et (6. ábra). Az AN11187 gén és az NDC1 klaszter legközelebbi génje (*hxnZ*) közötti távolság 40748 bp. Ez a távolság összhangban van a genetikai keresztezésekkel mért távolsággal, amelyet a *hxnS* és *hxn6* lókuszok között találtak.



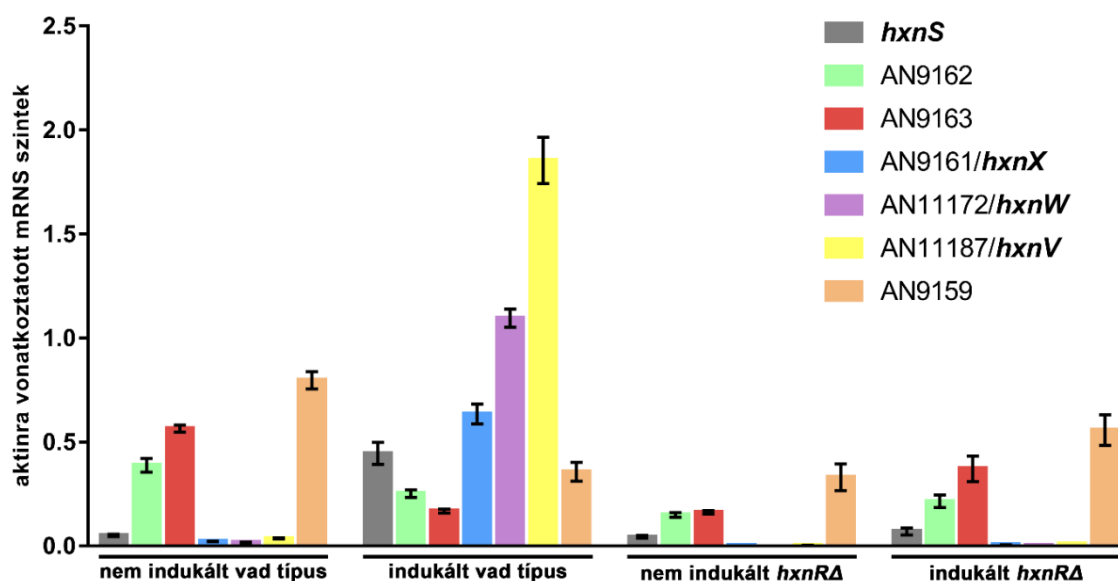
**6. ábra: A génbank plazmid szekvenálása során azonosított genomi régió sematikus ábrázolása.**

A 8256 bp hosszú genomi régió határain részlegesen van jelen az AN9159 és AN9162 gén (megszakított dobozok), és ezek között az AN11187, AN11172 és AN9161 gének találhatók (egész dobozok).

Annak lehetőségét kizártuk, hogy a plazmidon részlegesen jelen lévő gének okozták a *hxn6* komplementációját, így csak az AN11187, AN11172 és AN9161 géneket szekvenáltuk meg a *hxn6* törzsből és a szekvenciákat összehasonlítva az adatbank megfelelő szekvenciáival (indítószekvenciákat lásd 4. mellékletben) az AN11187 génben találtunk egy nukleotid (nt) eltérést, amely a *hxn6* allélben G1171A mutációt okozott. A mutáció az AN11187 cDNS szekvenciája alapján (lásd 6.2. alfejezet) lefordított fehérjében W296STOP (nonsense) mutációnak felel meg. Ez alapján a 629 AS hosszúságú fehérje helyett a *hxn6* törzsben csak egy 295 AS-ból álló csonkolt fehérje íródik át, amely funkcióvesztést okoz az AN11187 géntermékben.

Ezt követően transzkriptum analízist végeztünk (relatív „standard curve” módszerrel elemzett RT-qPCR analízissel) az AN11187 génen, amelyet kiterjesztettünk a szomszédos AN9159 és AN11172 génekre is. A transzkriptum elemzést vad típusú és *hxnRA* törzseken végeztük el nem indukált (a tenyésztés neutrális, se nem represszáló, se nem indukáló acetamid nitrogénforráson történt 10 órán át) és indukált (neutrális acetamid nitrogénforráson történő 8

óra tenyésztést követően a tápoldathoz 1 mM 6-NA-at adagoltunk és további 2 órán át inkubáltunk) körülmények között. Az AN11187 és az AN11172 is koregulációt mutatott az NDC1 klasztert reprezentáló *hxnS* génnel, tehát mindkét gént a NA katabolikus útvonal résztvevőinek tekinthettük (7. ábra). Az AN9159 gén a 6-NA indukciótól és a HxnR transzkripció faktortól teljesen független módon fejeződik ki (7. ábra), ezért ezt a gént nem tekintettük a NA katabolikus út tagjának. Ezt követően vizsgáltuk az AN11172 géntől upstream elhelyezkedő három szomszédos gén (AN9161, AN9162 és AN9163) kifejeződését is. Közülük csak az AN11172-vel közvetlen szomszédságban levő AN9161 gén mutatott *hxnS*-el megegyező regulációt, a másik két gén azonban 6-NA inducortól és HxnR-től független kifejeződést mutatott (7. ábra). Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy azonosítottunk egy 3 génből (AN11187, AN11172 és AN9161) álló klasztert (a továbbiakban NDC2 klaszter), amely génjei koregulációt mutatnak az NDC1 klaszter génjeivel, és vélhetőleg szerepet játszanak a NA katabolizmusában. Az AN11187 gént *hxnV*-nek, az AN11172 gént *hxnW*-nek, az AN9161 gént pedig *hxnX*-nek neveztük el.



7. ábra: A *hxnV*, *hxnW* és *hxnX* gének, valamint a szomszédos gének génkifejeződésének vizsgálata RT-qPCR-rel.

Az AN11187 (*hxnV*), AN11172 (*hxnW*) és AN9161 (*hxnX*) gének, valamint a velük szomszédos AN9162, AN9163 és AN9159 gének expressziós szintje vad típusú és *hxnRA* (*hxnR* deléció) törzsekben nem indukált és indukált (1 mM 6-NA-val végzett indukció) körülmények között. A nem indukált körülmény 10 óra acetamidon történő tenyésztés volt. Az indukált körülmény esetén 8 óra acetamidon történő tenyésztést követően a tápoldatot 1 mM 6-NA-val egészítettük ki, majd további 2 órán át inkubáltunk. Háztartási génként a gamma-aktint (*acnA*), kontrollként pedig a *hxnS* gént használtuk. Az RT-qPCR eredményeket a „relative standard curve” elemzési módszerrel kaptuk. Az ábrán három biológiai ismétlés szórási eredményeit tüntettük fel.

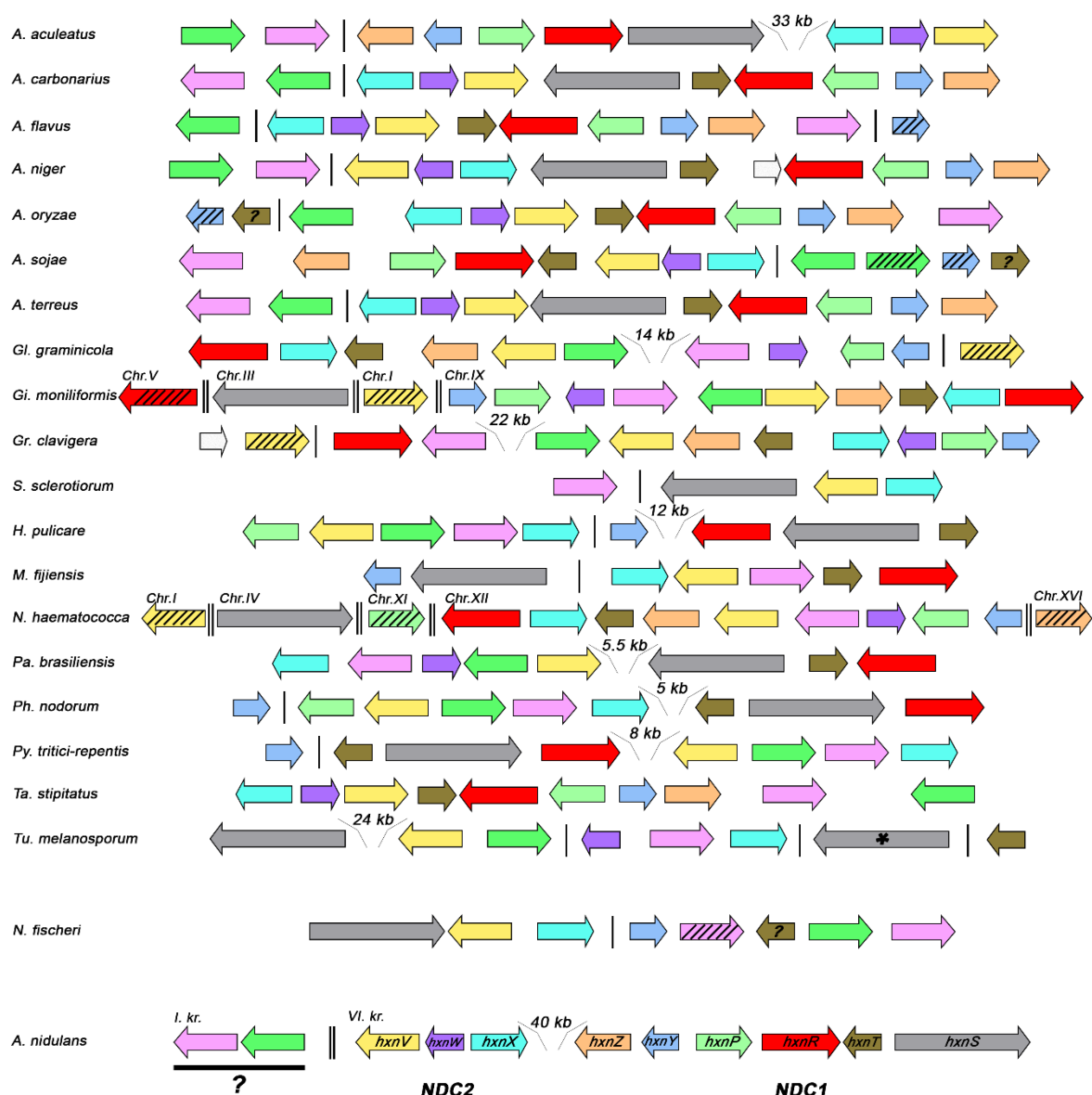
### 6.1.2. *In silico* megközelítés –a *hxn* gének egymáshoz viszonyított genomi elrendeződésének vizsgálata

Szinténia összefüggést mutató ortológkeresési eljárással mintegy 200 elérhető *Pezizomycotina* genomot vizsgáltunk meg a JGI Fungal Genome Portal adatbázis felületén. Fajonként kigyűjtöttük az NDC1 és NDC2 gének ortológjait a genomi környezetüket is mutató adatokkal együtt és összehasonlító vizsgálattal elemeztük a gének előfordulását és relatív sorrendjét. Azon kívül, hogy a vizsgált gombagenomokban az NDC1 és NDC2 klaszterek nem mindig különültek el egymástól, hanem általában egyetlen klaszterbe szerveződtek, felfigyeltünk arra, hogy bizonyos gének génpárokba rendeződve erős konzerváltságot mutatnak. Érdekes módon egyes esetekben a génpárok tagjai általunk *hxn*-ként nem azonosított gének voltak. A *hxnS* a *hxnT*-vel, a *hxnP* a *hxnY*-nal, a *hxnW* az AN6518-cal, a *hxnV* pedig az AN10833-mal alkotott génpárokat (1. Táblázat). A 6.1.3. alfejezetben részletesen leírt módon transzkriptum analízissel igazoltuk, hogy az I. kromoszómán található AN6518 és az AN10833 is a NA katabolikus út szabályozása alatt áll, azaz feltehetően részei a NA katabolikus folyamatnak. Az AN6518-at *hxnM*-nek, az AN10833 gént pedig *hxnN*-nek neveztük el.

1. Táblázat: Az erősen konzervált génpárokat reprezentáló néhány faj, amelyek *hxn* génjeinek genomi elrendeződését a 8. ábrán mutatjuk be.

Génpár	Példa faj
<i>hxnS-hxnT</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i> , <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> , <i>Phaeosphaeria nodorum</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Hysterium pulicare</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. nidulans</i>
<i>hxnP-hxnY</i>	<i>Talaromyces stipita</i> , <i>Nectria haematococca</i> , <i>Grosmannia clavigera</i> , <i>Gibberella moniliformis</i> , <i>Glomerella graminicola</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. nidulans</i>
<i>hxnW</i> - AN6518 ( <i>hxnM</i> )	<i>Tuber melanosporum</i> , <i>Pa. brasiliensis</i> , <i>Gi. moniliformis</i> , <i>Gl. graminicola</i> , <i>Nectria haematococca</i>
<i>hxnV</i> - AN10833 ( <i>hxnN</i> )	<i>Bo. dothidea</i> , <i>Tu. melanosporum</i> , <i>Ph. nodorum</i> , <i>Pa. brasiliensis</i> , <i>H. pulicare</i> , <i>Gr. clavigera</i> , <i>Gi. moniliformis</i> , <i>Gl. graminicola</i>

A vizsgálatba bevont genomok közül kiválasztottuk azokat, amelyek a klasztergének eltérő elrendeződését reprezentálják (6. melléklet) és sematikus ábrán (8. ábra) foglaltuk össze klasztereiket annak bemutatására, hogy a klasztert hordozó genomi DNS szakasz gyakori génátrendeződések színtere.



**8. ábra: A JGI adatbázis felületről gyűjtött klasztergén ortológok genomon belüli szerveződésének sematikus ábrázolása különböző reprezentatív *Pezizomycota* fajokban.**

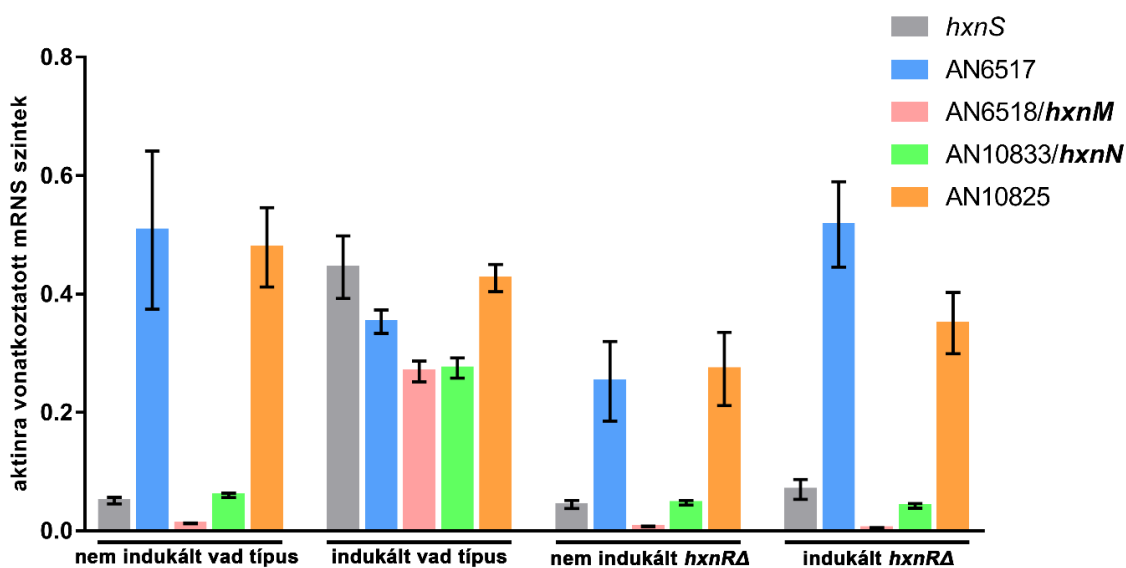
Az azonos szín az ortológ géneket jelöli. A színek az *A. nidulans* ábrázolásra felírt gének ortológjait jelölik.

A sávozott nyilak a duplikálódott géneket, a csillagozottak a pszeudogéneket, a kérdőjeles pedig az adott génnel homológ géneket jelölik. A két függőleges vonal kromoszómahatárokat jelöl, míg az egy függőleges vonal a szoros kapcsoltság hiányára utal ugyanazon kromoszómán. Az *A. nidulans*-ban kérdőjel fölött található zöld és halvány lila színekkel jelzett gének az AN10833 (későbbiekben *hxnN*) és az AN6518 (későbbiekben *hxnM*) géneket jelölik. A fehér színnel jelzett gén egy bakteriális eredetű nitroreduktáz (AN8360), amely nem mutat koregulációt az NDC1 génekkel, nem része a NA katabolikus útvonalnak (Ámon és mtsai., 2017). A feltüntetett fajok az ábrázolás sorrendjében a következők: *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus terreus*, *Glomerella graminicola*, *Gibberella moniliformis*, *Grosmannia clavigera*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Hysterium pulicare*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Nectria haematococca*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Talaromyces stipitatus*, *Tuber melanosporum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus nidulans*.

Az ábrázolt gének lokalizációjának mintázata azon kívül, hogy gyakori genomátrendeződésekről árulkodik, duplikációs és deléciós eseményekről is tanúskodik. Már az NDC1 klasztergének különböző fajokban történő előfordulásának összehasonlító elemzése során kiderült, hogy számos gombacsoportból hiányoznak kulcsfontosságú klasztergének (pl. a transzkripció faktort kódoló *hxnR* gén, és/vagy a *hxnS*, amely a PHII-t kódolja). Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy néhány gombafaj nem képes a NA-at nitrogénforrásként hasznosítani (Ámon és mtsai., 2017). Jelenleg folyik olyan adatelemzés (kollaborációs partnerek bevonásával), amely annak megválaszolására irányul, hogy vajon a génklaszter létrejöttét követően a gombafajok evolúciójával rendeződött-e át a klaszter a jelenleg látható sokféle elrendezést eredményezve, vagy pedig folyamatosan, egymástól függetlenül evolválódott (konvergens evolúció). Az értekezésben be nem mutatott kezdeti elemzések alapján ez utóbbi esemény valószínűsíthető.

#### 6.1.3. Az AN6518 és AN10833 gének és az őket határoló szomszédos gének regulációjának vizsgálata – az NDC3 génklaszter felfedezése

Annak kiderítésére, hogy az *in silico* módszerrel azonosított AN6518 és AN10833 gének szerepet játszanak-e a NA lebontási útvonalban, relatív „standard curve” módszerrel elemzett RT-qPCR kísérleteket végeztünk nem-indukált és indukált (1 mM 6-NA-val végzett indukció) körülmények között tenyésztett (a körülmények megegyeznek a 6.1.1. fejezetben részletezettekkel) *hxnR*<sup>+</sup> és *hxnRΔ* allélt hordozó törzsek cDNS-ével. A két feltételezett *hxn* gén mellett a vizsgálatba bevontuk a velük szomszédos géneket is (AN6517 és AN10825) (9. ábra).



9. ábra: A *hxnM* és *hxnN* gének, valamint a velük szomszédos gének kifejeződésének vizsgálata RT-qPCR-rel.

Az AN6518 (*hxnM*) és AN10833 (*hxnN*) gének, valamint a velük szomszédos AN6517 és AN10825 gének mRNS szintje vad típusú és *hxnRΔ* (*hxnR* deléció) törzsekben nem indukált és indukált (1 mM 6-NA-val végzett indukció) körülmények között. A nem indukált körülmény 10 óra acetamidon történő tenyésztés volt. Az indukált körülmény esetén 8 óra acetamidon történő tenyésztést követően 1 mM 6-NA-val egészítettük ki a tápoldatot és további 2 órán át inkubáltunk. Háztartási génként a gamma-aktin génjét (*acnA*), kontrollként pedig a *hxnS* gént használtuk. Az RT-qPCR eredményeket a „relative standard curve” elemzési módszerrel kaptuk. Az ábrán három biológiai ismétlés szórási eredményeit tüntettük fel.

A transzkriptum vizsgálat alapján azonosítottunk egy, a NA lebontásában részt vevő *hxnM* és *hxnN* géneket tartalmazó harmadik klasztert az I. kromoszómán, amelyet NDC3-nak neveztünk el (10. ábra).



**10. ábra: A NA lebontásában részt vevő gének sematikus ábrája.**

A két függőleges vonal kromoszómahatárokat jelöl. A színes nyilak az egyes géneket és orientációjukat jelölik. I. kr.: I. kromoszóma, VI. kr.: VI. kromoszóma. A tört vonal az NDC1 és NDC2 között 40 kb genomai távolságot jelöl.

## 6.2. A *hxnV* gén cDNS szekvenciájának meghatározása

Habár az AspGD adatbázisban gépi annotációval megállapítják az exon-intron határokat és az alapján prediktálják egy gén által kódolt fehérje szekvenciáját, korábbi tapasztalataink alapján előfordul, hogy az adatbank tévesen prediktál intronokat vagy intron pozíciókat. Annak érdekében, hogy *in silico* analízist végezhesünk az NDC2 és NDC3 klaszterek *hxn* géntermékein, elengedhetetlen volt, hogy cDNS szekvenálással megállapítsuk a *hxn* gének exon szekvenciáját és az azokról készített AS szekvenciákkal dolgozzunk tovább a fehérje-funkció elemzések során. A cDNS szekvenálások során (az indítószekvenciákat a 4. mellékletben listáztuk) a *hxnX*, *hxnW*, *hxnM* és *hxnN* gének cDNS szekvenciája azonosnak bizonyult az AspGD adatbázisban található adatokkal, azonban eltérést találtunk a *hxnV* gén esetén (11. ábra).

A *hxnV* szekvenciájának vizsgálata során megfigyeltük, hogy az adatbázisban exonként van prediktálva egy 53 nt hosszúságú szakasz (az 1033. nt-tól az 1085. nt-ig tartó szekvencia), mely a cDNS szekvenálás alapján egy intront kódol. Megállapítottuk azt is, hogy az adatbázis 1131. nt-ja utáni, intronként prediktált szekvencia a cDNS szekvenálás alapján egy 32 nt hosszúságú exon szekvencia (11. ábra „A” panel). Továbbá kiderítettük, hogy az adatbázisban a 2179. nt-tól a 2442. nt-ig tartó intron szekvencia nem létezik, és a *hxnV* gén valójában a genom 2266. nt-nál véget ér (11. ábra „B” panel).

**A**

```

adatbázis cDNS 957 CGGAAACTACGTCGTTGGGCAGCGCGTGGCGAGACATTTCTCTGATCCTGATTACCAGAT
saját cDNS      957 CGGAAACTACGTCGTTGGGCAGCGCGTGGCGAGACATTTCTCTGATCCTGATTACCAGAT
*****

adatbázis cDNS 1017 CTTCAATTGCTGGCGATGCACGTCCCTTCCGTCTGACCTCTTTCTCAGTTTGTCTAACAG
saját cDNS      1017 CTTCAATTGCTGGCGAT-----
*****

adatbázis cDNS 1077 GTTCTTTAGGCCGGTCACTGCCACTCTGCGCTCGCCGCCCAAGGTGCAAACACCA-----
saját cDNS      1033 -----GCCGGTCACTGCCACTCTGCGCTCGCCGCCCAAGGTGCAAACACCAAGTATG
*****

adatbázis cDNS 1132 -----CTGAACCTAGTGGCGCGTGGCCTAGCCTCTCCG
saját cDNS      1084 CACGACTCTTTCAACCTGGCATGGAAGCTGAACCTAGTGGCGCGTGGCCTAGCCTCTCCG
*****

adatbázis cDNS 1165 TCTCTGCTGGAGACTTACGAAACTGAGCGGCGCAAGATCGCAAACGACCTCATTGCCTTT
saját cDNS      1144 TCTCTGCTGGAGACTTACGAAACTGAGCGGCGCAAGATCGCAAACGACCTCATTGCCTTT
*****

adatbázis cDNS 1225 GACGCCGAGCACTGTGCTGCATTGAGGCAGGCGAAGCCGCCCTTGCCAGGAACCTTGTGAT
saját cDNS      1204 GACGCCGAGCACTGTGCTGCATTGAGGCAGGCGAAGCCGCCCTTGCCAGGAACCTTGTGAT
*****

```

**B**

```

adatbázis cDNS 1785 TGTGGAAGGGTGATTGAGAAGTGGGTTGGGGAGCTGCCAGAAACACAGGCTGGGATTGT
saját cDNS      1764 TGTGGAAGGGTGATTGAGAAGTGGGTTGGGGAGCTGCCAGAAACACAGGCTGGGATTGT
adatbázis genomi 2101 TGTGGAAGGGTGATTGAGAAGTGGGTTGGGGAGCTGCCAGAAACACAGGCTGGGATTGT
*****

adatbázis cDNS 1845 GCTAGTGAGGCCAGACGG-----
saját cDNS      1824 GCTAGTGAGGCCAGACGGGTATGTTGCGGGCCTTAGGGTTTGGGATCTCGGTGAGGGTGA
adatbázis genomi 2161 GCTAGTGAGGCCAGACGGGTATGTTGCGGGCCTTAGGGTTTGGGATCTCGGTGAGGGTGA
*****

adatbázis cDNS -----
saját cDNS      1884 GGTGGCAAGACGGTGGGTGGAGGAGTATTTGGATTCTTCTGTGA-----
adatbázis genomi 2221 GGTGGCAAGACGGTGGGTGGAGGAGTATTTGGATTCTTCTGTGAAGATTCTGCCATT

adatbázis cDNS -----
saját cDNS -----
adatbázis genomi 2281 TCCAAGCGACTTTCTTTATCAAAGGTCCAGCTATATCAGGTTAACAGGATTAATGACATA

adatbázis cDNS -----
saját cDNS -----
adatbázis genomi 2341 TCAATATGGGATTATTGTAGTTTATTGTAGCAAAGGCCTTATCATCACTGTATAGACTA

adatbázis cDNS 1863 -----CAATTACCCCGCACGCC
saját cDNS -----
adatbázis genomi 2401 GATAGACTTCCAATGACTAGGGTTTCTATCATAATTTACCAGCAATTACCCCGCACGCC

adatbázis cDNS 1881 GAATGCATAA
saját cDNS -----
adatbázis genomi 2461 GAATGCATAA

```

# **11. ábra: A *hxnV* adatbázisból letöltött exon szekvenciájának összehasonlítása az általunk cDNS szekvenálással generált *hxnV* szekvenciával és a genom szekvenciával.**

A panel: Az adatbázistól eltérő exont és intront tartalmazó szekvenciariészlet. Csillaggal jelöltük az egyező bázisokat, piros kerettel az adatbázisban exonnak vélt szekvencia látható, amely valójában intron, zöld kerettel pedig az exon szekvencia van jelölve, amely az adatbázis alapján egy intron. B panel: A *hxnV* szekvencia 3' vége. Csillaggal jelöltük az egyező nukleotidokat, bordó kerettel pedig a *hxnV* STOP kodonját.

A cDNS szekvenálás alapján megállapított exon-intron határokat a 2. Táblázat mutatja.

## 2. Táblázat: A *hxnV* gén exon-intron határai.

Exon	1-116 nt
Intron	117-169 nt
Exon	170-344 nt
Intron	345-441 nt
Exon	442-805 nt
Intron	806-866 nt
Exon	867-1094 nt
Intron	1095-1167 nt
Exon	1168-1250 nt
Intron	1251-1303 nt
Exon	1304-2200 nt

Eredményeink alapján az adatbázis szerinti 629 AS hosszúságú fehérje helyett egy 600 AS-ból álló, az adatbázisban leírtaktól eltérő AS összetételű fehérje íródik át. A cDNS szekvenálás alapján a HxnV fehérje AS szekvenciája a következő:

MARSADHDQGFANIDTDAAPAGETTVVIVGAGPSGLMLAVNLVRLGTPIVLLDDRPDKTSTGKADGIQPKTIETL  
KQLRLADKLLRDGARIYDISFWDSTESHPLRRKGRQTHYPDHLVGASDPYILLVHQGMLEDVLIDDLAERGVTVT  
RNSSFLSCSRNPSKKLDVVYEDQSTGTTKKVIQTEYLVGCDGARSSVREFIPDAQLEGEMTNASWGVLDGVIETDF  
PDLWSKVAVRTHTVGSLLWIPRERGMTRLYVELSATAGERIDKAKATPQYVMERAKEAMKPFSLWKSIEWFGNY  
VVGQRVARHFSDPDYQIFIAGDAGHCHSALAAQGANTSMHDSFNLAWKLNLVARGLASPSLLETYETERRKIAND  
LIAFDAEHCAAFEAGEAALARNFDENIRFISGVGAEYDASILTQTKVSDAGKGSRRLLKPGALLIPAKATRYIDAN  
PVDIQLDVPLLGGFRLYFLIPNVSAAKEKGFLVVCQILSSPTSILAI SAEKAKESYTSR SRGWSATDAYQVPER  
YTTVSEIITLSLISGSKREVFEIADLPLALQKSRWTVYLDDVEGCIEKWVGELPETQAGIVLVRPDGNYPRTPNA

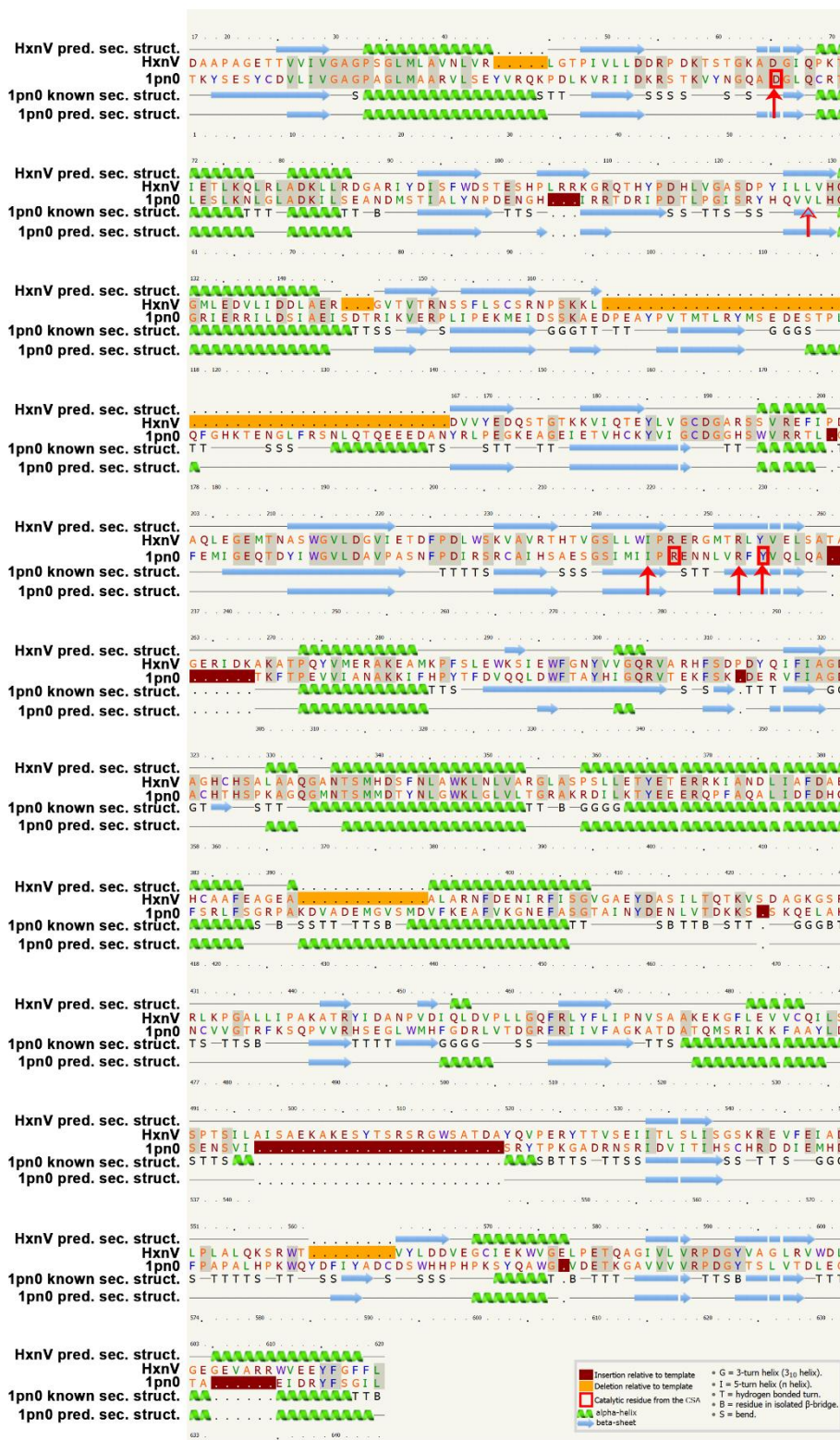


### 6.3. Az NDC2 és NDC3 géntermékek *in silico* jellemzése

A *hxnV*, *hxnX*, *hxnW*, *hxnM* és *hxnN* gének felfedezését követően *in silico* funkcióelemző vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy információt nyerjünk a lebontási útvonalban részt vevő gének útvonalban betöltött lehetséges szerepéről.

#### 6.3.1. A *HxnV* jellemzése

A *hxnV* gén (AN11187, 2266 nt) egy 600 AS hosszúságú fehérjét kódol, mely a 49. és a 64. AS között rendelkezik egy transzmembrán doménnel, melyet egy UbiH FAD-függő oxidoreduktáz domén (COG0654) és egy PHOX-C domén (cd02979) követ. Az utóbbi domén FAD-függő fenol hidroxilázokra jellemző, melyek C-terminálisukon a dimerizációban részt vevő TRX-fold doménnel rendelkeznek. A PHOX enzimek a fenol és egyszerű fenol származékok orto pozícióban történő hidroxilálását katalizálják, mely során NADPH-t és oxigént használnak fel. A *HxnV* fehérje legközelebbi szerkezeti homológja a *Trichosporon cutaneum* fenol 2-monooxygenáza (fenol hidroxiláz, PDB: 1pn0; 100% megbízhatóság, 96% lefedettség és 33% azonosság). A *T. cutaneum* fenol 2-monooxygenáz Tyr289 (Tyr255 a *HxnV* fehérjében), Ile279 (Ile245 a *HxnV* fehérjében) és Val114 (Leu128 a *HxnV* fehérjében) AS-ai hidrofób kölcsönhatást létesítenek a fenolgyűrű 2. és 6. szénatomja között, míg a Tyr289 (Tyr255 a *HxnV* fehérjében) és Asp54 (Asp65 a *HxnV* fehérjében) AS-ak hidrogén kötést alakítanak ki a szubsztrát molekula hidroxil csoportjával (12. ábra) (Enroth, 2003). Ezen kívül a Tyr289 (Tyr255 a *HxnV* fehérjében) hidrogén kötésen keresztül képes kapcsolódni a FAD kofaktorhoz is (Enroth, 2003). A *T. cutaneum* fenol 2-monooxygenázának aktív centrumát alkotó AS-ak és a *HxnV* megfelelő AS-ainak jelentős azonossága alapján ésszerű feltételezni, hogy a *HxnV* szubsztrátja a piridinggyűrű egy hidroxilált származéka. A fenol 2-monooxygenáz és annak fenol szubsztrátjával analógiát feltételezve lehetséges, hogy a *HxnV* szubsztrátja a heterociklikus piridinggyűrűn olyan szénatomon hidroxilált, amelynek szomszédjai szintén szénatomok. Ezek a feltételek a 2,5-DP molekula 5. szénatomja esetében teljesülnek. Elméletileg a hidroxilált 5. szénatomtól orto pozícióban történő hidroxiláció 2,4,5-trihidroxipiridint, vagy 2,3,6-trihidroxipiridint eredményez. *P. putida* esetében a lebontási útvonalban a 2,5-DP-t egy, az extradiol gyűrűhasító dioxigenázok egy új családjának alapító tagja, a NicX használja szubsztrátként, és a 2,5-DP molekulát az 5. és 6. szénatom között hasítva N-formil-maleinsavamidot képez. A *HxnV* legközelebbi *P. putida* homológja a p-hidroxibenzoát hidroxiláz (PDB: 6dll) 23% azonossággal (53% lefedettség). Mindezek értelmében az *A. nidulans* lebontási útvonala a 2,5-DP-t követően eltér a *P. putida* útvonalától, és a 2,5-DP gyűrűjének felnyitása helyett a 2,5-DP hidroxilálása feltételezhető.



12. ábra: A HxnV szerkezeti hasonlóságot mutat a *Trichosporon cutaneum* fenol 2-monooxygenázával (fenol hidroxiláz).

A HxnV prediktált másodlagos szerkezetének és a *T. cutaneum* fenol-2-monooxygenáz (PDB: 1pn0) ismert (known sec. struct.) és prediktált (pred. sec. struct.) másodlagos szerkezetének összehasonlítása Phyre2 analízis (Kelley és mtsai., 2015) segítségével. A piros nyilak a fenol-kötésben részt vevő AS-akat jelölik.

### 6.3.2. A *HxnX* jellemzése

A 461 AS hosszúságú fehérjét kódoló *hxnX* gén (AN9161, 1582 nt) génterméke UbiH FAD-függő oxidoreduktáz domént (COG0654) tartalmaz, amely NADB\_Rossmann szupercsalád (cl21454), PRK06847 szupercsalád (cl27550) és FAD\_kötő\_3 szupercsalád (pfam01494, cl27552) doménekre jellemző tulajdonságokkal rendelkezik és nem specifikus kapcsolatban áll a Szalicilát 1-monooxygenáz családdal (TIGR03219). A fehérje legközelebbi szerkezeti homológja (100% megbízhatóság, 32% azonosság és 83% lefedettség) a *HxnX* fehérjével valószínűleg azonos funkcióval bíró 6-hidroxinikotinsav 3-monooxygenáz (NCBI: WP\_010954763.1, PDB: 5eow), a *P. putida* KT2440 NicC fehérjéje (Hicks és mtsai., 2016). A NicC-ről (Jimenez és mtsai., 2008), valamint az ezzel homológ *P. fluorescens* TN5 fehérjéről (Nakano és mtsai., 1999) bebizonyították, hogy membrán-kapcsolt monooxygenáz flavoenzimek dekarboxiláz funkcióval, melyek NADH-t, FAD-ot és O<sub>2</sub>-t használnak fel a 6-NA 2,5-DP-né történő hidroxilálása során (Nakano és mtsai., 1999). A NicC His211 és Tyr215 AS-ai (melyek *HxnX* megfelelői a His232 és Tyr236) közvetlenül kölcsönhatásba lépnek a 6-NA szubsztráttal és hat további AS-val együtt (melyek *HxnX*-ben nem mutatnak konzerváltságot) részt vesznek az aktív centrum kialakításában (Hicks és mtsai., 2016) (13. ábra). A 6-NA-kötő AS-ak konzerváltsága a *HxnX*-ben arra utalhat, hogy a NicC-hez hasonlóan a *HxnX* is elfogadja a 6-NA-t szubsztrátként és feltehetően katalizálja annak dekarboxilálását és hidroxilálását.

A *HxnX* C-terminálisán található peroxiszómás lokalizációs szignál (SRL), valamint az *in silico* vizsgálatok során kapott normál megbízhatóságú (0,36) és magas (76,7%) valószínűségű peroxiszómás lokalizáció predikció (YLoc-HighRes Fungi) alapján a *HxnX* feltételezhetően a peroxiszómákban lokalizálódik. Ezen túlmenően, a 20-35 AS-ból álló transzmembrán domén alapján a *HxnX*, hasonlóan a *P. fluorescens* esetén tapasztaltakkal (Nakano és mtsai., 1999), membránhoz kapcsolt fehérje. A *HxnX* legközelebbi ismert gomba homológja a *Candida parapsilosis* CDC317 4-hidroxibenzoát 1-hidroxiláza, az MNX1 (37 % azonosság, CGD: CPAR2\_102790, GeneBank: CCE40241.1, (Holesova és mtsai., 2011). Hasonlóságot feltételezve a *P. putida* NicC és a *C. parapsilosis* MNX1 fehérjékkel (a benzolgyűrűt piridinggyűrűre cserélve), a *HxnX* valószínűleg dekarboxilálja a 6-NA-at, majd a képződő 2-hidroxi-nikotinsav piridinggyűrűjének 5-hidroxilálása révén 2,5-DP keletkezik.



13. ábra: A HxnX szerkezeti hasonlóságot mutat a *P. putida* 6-hidroxinikotinsav 3-monooxigenázával, a NicC-vel.

**A panel:** A HxnX valószínűsíthető másodlagos szerkezetének (pred. sec. struct) és a *P. putida* NicC (PDB: 5eow) ismert (known sec. struct) és valószínűsíthető másodlagos szerkezetének összehasonlítása Phyre2 analízis (Kelley és mtsai., 2015) segítségével. A teli piros nyilak a szubsztrát-kötő AS-akat, míg az üreges piros nyilak a további aktív centrum képző AS-akat jelölik, melyek a NicC aktív centrumába térképeződtek. **B panel:** A HxnX és a *P. putida* NicC (NP\_746074) (Jimenez és mtsai., 2008) szekvenciájának összehasonlítása. A szekvenciák illesztése Muscle programmal történt, majd a kapott eredményeket MView programmal jelenítettük meg. A piros nyilak a HxnX 6-NA szubsztrát-kötő AS-ait jelölik.



### 6.3.3. A *HxnW* jellemzése

A *hxnW* génről (AN11172, 861 nt) egy mindössze 254 AS hosszúságú fehérje íródik át, amely a rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz (SDR) család MDH-szerű\_SDR\_c típusú (cd05352) fehérjéihez hasonló jellegzetességekkel rendelkezik. A *HxnW* rendelkezik egy szerkezeti konzervált NADB\_Rossmann-fold doménnel, melyben Ser (S146) és Asn (N116) AS-ak, valamint egy konzervált Y(X)<sub>3</sub>K motívumot formáló Tyr (Y161) és Lys (K165) alkotja a konzervált katalitikus tetrádot (Kavanagh és mtsai., 2008) (14. ábra). Ezen kívül, a *HxnW* fehérjében megtalálható egy gomba ketoreduktázokra jellemző NAD(P)-kötő TG(X)<sub>3</sub>GXG motívum is (14-21 AS). A különböző MDH-szerű\_SDR\_c típusú fehérjék esetén a C-terminális régió a specifikus szubsztrát kötésnek megfelelően variábilis. Az SDR családba tartozó enzimek a reakciók széles körét képesek katalizálni, többek között izomerizációt, dekarboxilációt, epimerizációt, C=N kötés redukcióját, dehidratáz aktivitást, dehalogenizációt, az enoil-KoA redukcióját és karbonil-alkohol oxidoredukcióját (Kavanagh és mtsai., 2008). A *HxnW* ortológja *Saccharomyces cerevisiae* S288C Sps19p fehérjéje (30% azonosság 96% lefedettséggel), egy NADPH-függő peroxisómális 2,4-dienoil-KoA reduktáz, mely homodimer formában működik (Gurvitz és mtsai., 1997). A *HxnW* legközelebbi jellemzett szerkezeti homológja a *Gluconobacter oxydans* poliol dehidrogenáza, a Gox2181 (PDB: 3awd; 100% megbízhatóság, 98% lefedettség) (14. ábra), mely homotetramert képezve NAD(H)-függő módon látja el funkcióját (Liu és mtsai., 2011). Az SDR fehérjék szerkezeti-funkcionális modelleinek hiánya miatt a *HxnW* funkciójára nem tudunk következtetni, azonban azt feltételezzük, hogy vagy ketoreduktázként működik, vagy dekarboxilációt végez a NA lebontás valamely aromás köztestermékén.



14. ábra: A HxnW szerkezeti hasonlóságot mutat a *Gluconobacter oxydans* Gox2181 poliol dehidrogenázával.

A HxnW valószínűsíthető (pred. sec. struct) másodlagos szerkezetének és a *G. oxydans* Gox2181 (PDB: 3awd) ismert (known sec. struct) és valószínűsíthető másodlagos szerkezetének összehasonlítása Phyre2 analízis (Kelley és mtsai., 2015) segítségével. A bekeretezett AS-ak a gomba ketoreduktázokra jellemző TG(X)3GXG NAD(P)-kötő motívumot jelölik. A piros nyilak a NADB\_Rossmann-fold domén konzervált katalitikus tetrádját jelölik.

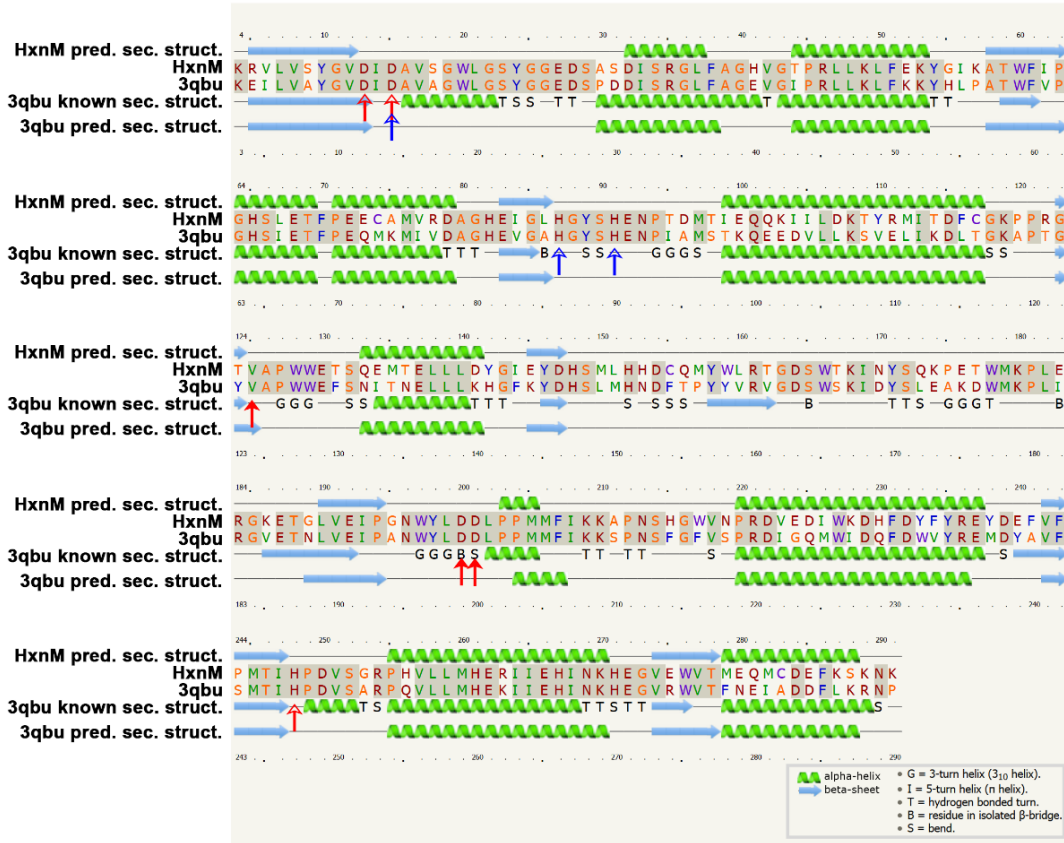
#### 6.3.4. A HxnM jellemzése

A *hxnM* gén (AN6518, 1095 nt) egy 307 AS hosszúságú fehérjét kódol, melyet egy CE4\_HpPgdA\_szerű domén (cd10938) alkot, amelyet a *Helicobacter pylori* peptidoglükán deacetiláza (HpPgdA; PDB: 3qbu) példáz. A HpPgdA 65% azonossággal a HxnM legközelebbi szerkezeti homológja (93% lefedettség és 100% megbízhatóság) (15. ábra). A HpPgdA (HP0310) katalitikus doménje tetramert képez és aktív helyén Zn iont hordoz (Shaik és mtsai, 2011). A HpPgdA fehérje Zn ionokat koordináló AS-ainak (His86/His90/Asp14), a vízmolekulákat kötő katalitikus AS-aknak (His247/Asp12/Asp14) és egyéb katalitikus AS-aknak (Asp199/Asp200/Val124) (Shaik és mtsai., 2011, Bhattacharjee és mtsai., 2017) megfelelő AS-ak konzerváltak a HxnM fehérjében (His87/His91/Asp15, His248/Asp13/Asp15 és Asp200/Asp201/Val125 AS-aknak felelnek meg HxnM fehérjében) (15. ábra). A HpPgdA deacetilálja a peptidoglükánokat az N-acetilglükózaminok és az N-acetilmuraminsavak N-kapcsolt acetyl csoportjaiban a C-N kötések hasításán keresztül (Bhattacharjee és mtsai., 2017).

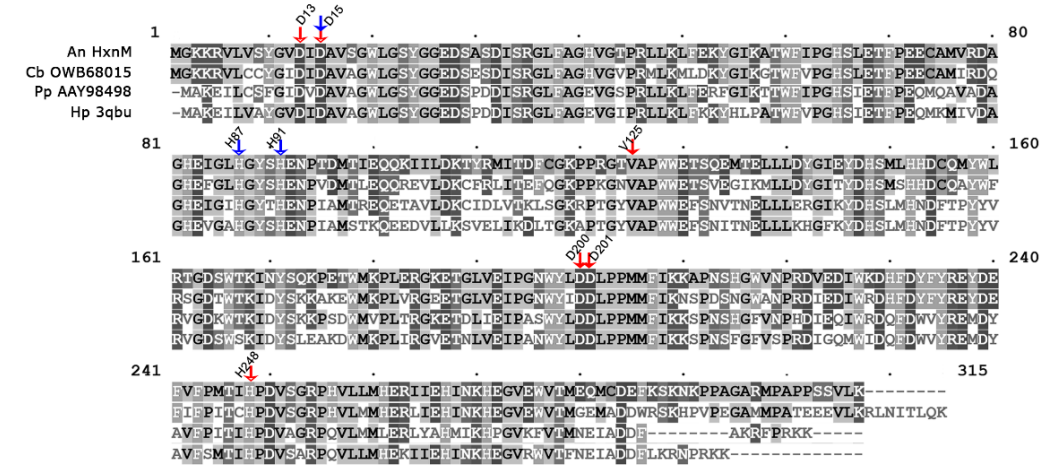
A HxnM 74,3% azonosságot mutatott (100% lefedettség) egy *Candida bondii*-ből származó enzimmel (OWB68015), melyet C-N (de nem peptid) kötés hidrolázként annotáltak (enzim család: EC 3.5.99, GO term: 0016810). A *P. putida* fehérjéken végzett BlastP keresés során egy ciklikus-imid-hidroláz (AAY98498) adott nagyfokú (64,2%) azonosságot a HxnM fehérjével (95,4 % lefedettséggel) (Shi és mtsai., 2007), míg a *P. putida* NA lebontási útvonalának gyűrűhasító enzime, a NicX (az extradiol gyűrűhasító dioxigenázok (cl19596) egy új családjának alapító tagja, mely az 5. és 6. szénatom között történő gyűrűhasítás katalizálásához Fe(II) iont és molekuláris oxigént használ) mindössze 13,8% azonosságot (91,9% lefedettség) mutatott. Az alapján, hogy a NicX és a HxnM különböző enzimes családok tagjai, arra következtethetünk, hogy a NA lebontása a különböző gombákban konvergens evolúció során alakult ki.

A HxnM és ciklikus imidázok (mind gomba, mind bakteriális) homológiája, valamint a C-N kötést hasító hidrolázok (például a HpPgda peptidoglükán deacetiláz) aktív helyén található Zn ion koordináló és vízmolekula kötő AS-ak nagyfokú hasonlósága alapján feltételezhető, hogy a HxnM a NA lebontás egy telített piridinggyűrűvel rendelkező köztestermékét hasítja fel egy szén és egy nitrogén molekula között.

A



B



15. ábra: A HxnM szerkezeti hasonlóságot mutat a *Helicobacter pylori* HpPgdA peptidoglükán deacetilázával.

A panel: A HxnM valószínűsíthető (pred. sec. struct) másodlagos szerkezetének és a *H. pylori* HpPgdA (PDB: 3qbu) ismert (known sec. struct) és valószínűsíthető másodlagos szerkezetének összehasonlítása Phyre2 analízis (Kelley és mtsai., 2015) segítségével. Az üres piros nyilak a katalitikus vízkötő AS-akat, a teli piros nyilak az egyéb katalitikus helyek AS-aikat, a kék nyilak pedig a HpPgdA Zn ion koordináló AS-aikat jelölik (Shaik és mtsai., 2011, Bhattacharjee és mtsai., 2017). B panel: A HxnM szekvenciájának összehasonlítása a *Candida bombii* hidrolázával (OWB68015), *Pseudomonas putida* ciklikus imid hidrolázával (AAY98498) és a *H. pylori* HpPgdA fehérjéjével. A szekvenciák illesztése Muscle programmal történt, majd a kapott eredményeket MView programmal jelenítettük meg. A nyilak a HpPgdA katalitikus helyének AS-aikat és a Zn ion koordináló AS-aikat jelölik, melyek megfelelnek a HxnM AS-ainak.



### 6.3.5. A *HxnN* jellemzése

Az 543 AS hosszúságú fehérjét kódoló *hxnN* gén (AN10833, 1851 nt) génterméke egy GatA típusú (Asp-tRNSAsn/Glu-tRNSGln amidotranszferáz A alegység, vagy kapcsolódó amidáz domén) amidáz doménből (pfam01425) áll, és a 463-478 AS régiója transzmembrán jellegzetességeket mutat. A *HxnN* *S. cerevisiae* (*AMD2*) és *Schizosaccharomyces pombe* (*Fah1*) ortológjai feltehetőleg amidázok. A *HxnN* legközelebbi szerkezeti homológja a *Rattus norvegicus* zsírsavamid-hidroláz 1 (FAAH) fehérjéje (PDB: 2vya; 100% megbízhatóság, 32% azonosság, 98% lefedettség) (16. ábra). Az amid csoport hidrolízisében szerepet játszó Ser-Ser-Lys katalitikus triádnak megfelelő AS-ak (Ser217/Ser241/Lys142 a FAAH fehérjében), a triádot támogató Ser AS (Ser218 a FAAH fehérjében), valamint az oxianion üreget képző AS-ak (Ile238/Gly239/Gly240/Ser241 a FAAH fehérjében; (Shin és mtsai., 2002, Mileni és mtsai., 2008) a *HxnN* esetében konzerváltak (Ser208/Ser232/Lys133, Ser209 és Ile229/Gly230/Gly231/Ser232) (16. ábra). Ezek alapján feltételezzük, hogy a *HxnN* lehasítja egy felnyílt gyűrűs szerkezetű köztestermék amid csoportját, amely ezt követően nitrogénforrásként hasznosulhat. A növekedési tesztek értelmében azonban a visszamaradó szénvegyület nem hasznosul szénforrásként.



16. ábra: A HxnN szerkezeti hasonlóságot mutat a *Rattus norvegicus* zsírsavamid-hidroláz 1 (FAAH) fehérjéjével.

A HxnN valószínűsíthető (pred. sec. struct) másodlagos szerkezetének és a *R. norvegicus* FAAH (PDB: 2vya) ismert (known sec. struct) és valószínűsíthető másodlagos szerkezetének összehasonlítása Phyre2 analízis (Kelley és mtsai., 2015) segítségével. A teli piros nyílak a katalitikus triádot, az üres piros nyíl a katalitikus triádot támogató Ser AS-at, a kék pontok pedig a FAAH oxianion üreget képző AS-ait jelölik (Shin és mtsai., 2002, Mileni és mtsai., 2008).

#### 6.4. A *hxnSΔ*, *hxnSΔ/hxnTΔ*, *hxnSΔ/hxnYΔ*, *hxnTΔ/hxnYΔ* és *hxnSΔ/hxnTΔ/hxnYΔ* deléciós törzsek létrehozása

Korábbi munkánk során már deletáltuk az NDC1 klaszter génjeit, és vizsgáltuk a *hxnSΔ*, *hxnTΔ* és *hxnYΔ* szimpla deléciós törzsek NA hasznosítási képességét (Ámon, 2018). A *hxnSΔ* törzs NA-at nem, 6-NA-at és 2,5-DP-t azonban képes nitrogénforrásként hasznosítani (Ámon és mtsai., 2017). Mivel a Hx diagnosztikus táptalajon (Hx nitrogénforrás PHI gátló Allp-lal és a NA katabolikus útvonal metabolit inducerével, 1 mM NA-val, 6-NA-val, vagy 2,5-DP-nel kiegészítve) történő növekedés a HxnS működésén alapul, a *hxnSΔ* törzs nem képes nőni a diagnosztikus Hx táptalajon (Ámon és mtsai., 2017). A *hxnTΔ* és *hxnYΔ* törzsek egymáshoz és a vad típushoz hasonló NA hasznosítási fenotípust mutattak, de 6-NA nitrogénforráson a *hxnTΔ* törzs növekedése nagy mértékben csökkent, a *hxnYΔ* törzs pedig alig észlelhető mértékben mutatott redukált növekedést (Ámon, 2018). A 2,5-DP-t mindkét deléciós törzs a vad típusú törzshöz hasonlóan hasznosította és a diagnosztikus Hx táptalajon is vad típusú módon növekedtek (Ámon, 2018). A tény, hogy a *hxnTΔ* és *hxnYΔ* törzsek képesek növekedni NA nitrogénforráson, de redukált növekedést mutatnak a NA-tól downstream 6-NA nitrogénforráson arra utalhat, hogy a lebontási útvonal a NA átalakulás kezdeti lépésénél alternatív útvonalakra ágazik el. Az, hogy a *hxnTΔ* és *hxnYΔ* törzsek NA hasznosítási profilja minőségileg megegyezik, felveti azt a kérdést is, hogy ugyanazon reakciólépésben vesznek-e részt, vagy egymást követő lépésekben.

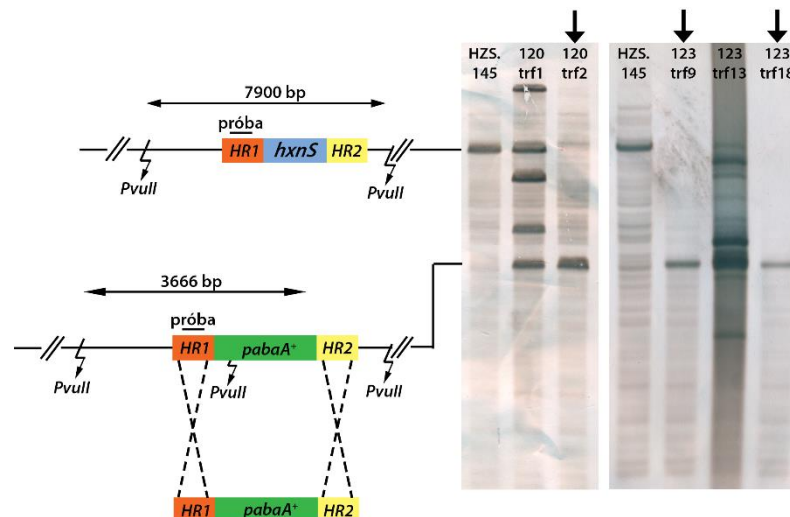
A kérdések megválaszolásának céljából a *hxnS*, *hxnT* és *hxnY* génekre nézve halmozottan deléciós mutánsokat hoztunk létre és vizsgáltuk azok NA hasznosítási képességét. A szimpla deléciós törzsek keresztezhetősége érdekében szükségessé vált, hogy a laborunkban használt *hxnSΔ::riboB<sup>+</sup>* törzsön kívül egy *hxnSΔ::pabaA<sup>+</sup>* törzset is létrehozzunk. A *hxnSΔ/hxnYΔ* dupla deléciót ugyanis az allélok erős kapcsoltsága miatt csak akkor tudjuk hatékonyan létrehozni keresztezéssel, ha a *hxnS* és a *hxnY* gének deléciója két különböző szelekciós marker génnel történt meg. A laborunkban korábban létrehozott *hxnSΔ* és *hxnYΔ* deléciós törzsekben a gének mind a két esetben *riboB<sup>+</sup>* marker génnel voltak deletálva, ezért szükséges volt az egyik deléció elkészítése újra, egy másik szelekciós marker génnel (*pabaA<sup>+</sup>*) (lásd 6.4.1. alfejezet). Az új, *hxnSΔ::pabaA<sup>+</sup>* törzzsel és a *hxnYΔ::riboB<sup>+</sup>* törzzsel már olyan genetikai keresztezést tudtunk végrehajtani (*hxnSΔ::pabaA<sup>+</sup>*, *pabaA1*, *riboB2* keresztezése *hxnYΔ::riboB<sup>+</sup>*, *riboB2*, *pabaA1* törzzsel), ahol direkt szelekciót tudtunk végezni a dupla deléciós mutánsok izolálására (lásd 6.4.2.2. alfejezet). A *hxnTΔ/hxnYΔ* dupla deléciós mutánst létre tudtuk hozni már meglévő *hxnTΔ* és *hxnYΔ* törzsek keresztezésével.

A *hxnSΔ/hxnTΔ* dupla mutánst nem kíséreltük meg keresztezéssel előállítani, mert a szülői törzsekben létrehozott deléciók egymás melletti géneket érintettek, és a két manipulált genomi régió közötti homológia olyan csekély, amely kérdésessé teszi a homológ rekombináció lehetőségét. Ezért a dupla mutáns létrehozását génszubsztitúciós kazetta transzformálásával, egy lépésben hajtottuk végre (lásd 6.4.2.1. alfejezet). A tripla deléciós mutáns létrehozását a *hxnSΔ/hxnTΔ* dupla mutáns és egy *hxnYΔ* mutáns genetikai keresztezésével hoztuk létre.

Bár a szóban forgó halmozott deléciós mutánsok jelen doktori munka keretében jöttek létre, ezek NA hasznosítási tesztjeit egy, az NDC1 klaszterre fókuszáló doktori értekezés keretén belül mutattuk be legelőször (Ámon, 2018).

#### 6.4.1. A *hxnSΔ* deléciós törzs létrehozása *pabaA*<sup>+</sup> szelekciós markerrel végzett génszubsztitúcióval

A *hxnS* gén delécióját *pabaA*<sup>+</sup> szelekciós marker génnel végeztük annak érdekében, hogy a *riboB*<sup>+</sup> szelekciós markerrel deletált törzsekkel történő keresztezést követően egyszerűen szelektálhassunk a dupla deléciós utódokra. A *hxnS* deléciós törzs létrehozásához egy *riboB2*, *pabaA1* auxotróf (HYS.120) és egy *anA1*, *riboB2*, *pabaA1* auxotróf (HYS.123) törzset használtunk. A génszubsztitúciós kazettát Double-Joint PCR módszerrel (Yu és mtsai., 2004) hoztuk létre *pabaA*<sup>+</sup> vad típusú gént használva szelekciós markerként. A kazetta létrehozásához felhasznált indítószekvenciákat a 4. melléklet tartalmazza. A transzformálást követően a para-amino-benzoészavra nézve prototróf, NA nitrogénforrást nem, 6-NA-at azonban hasznosítani képes transzformánsok közül kettő, illetve három törzset választottunk ki Southern analízisre. A Southern-hibridizációs stratégia a 13. ábrán látható. Mindkét transzformálást követően azokat a transzformánsokat választottuk ki a további munkánkhoz, amely a génszubsztitúciós konstrukciót egy kópiában hordozta a cél-lókuszban. Ezek alapján a HYS.120/trf2 (továbbiakban HYS.599), a HYS.123/trf9 (továbbiakban HYS.548), valamint a HYS.123/trf18 (továbbiakban HYS.549) transzformánsokat választottuk ki a vizsgálatainkhoz (17. ábra).



**17. ábra: A *hxnS* gén deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégia.**

A Double-Joint PCR eljárással létrehozott, *pabaA*<sup>+</sup> szekvenciát tartalmazó szubsztitúciós kazetta sémája az ábra bal oldalán látható. A narancssárga és sárga téglalapok a targetálást szolgáló, a genomi régióval homológ szakaszokat jelölik (HR1: a deletálás helyétől upstream irányba eső szekvencia, HR2: a deletálás helyétől downstream irányba eső szekvencia). A *hxnS*<sup>+</sup> és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét PvuII enzimmel emésztettük (a villám alakú nyílak az PvuII hasítóhelyeket jelölik). Hibridizációs próbának PCR eljárással (*hxnS* rdow frw és *hxnT* rev indítószekvenciák, lásd 4. melléklet) felszaporított szekvenciát használtunk, melyet az ábrán „próba” névvel jelöltünk. A kettős nyílak az PvuII-emésztésből származó termékek méretét jelölik. A jobb oldalon a két Southern-hibridizációs membránt ábrázoltunk a *hxnS*<sup>+</sup> (HZS.145) és a vizsgált transzformáns törzsek hibridizációs jeleivel. A felső séma az intakt *hxnS* lókuszt, az alsó a kazetta beépülése esetén létrejövő *pabaA*<sup>+</sup> szelekciós markerrel kicserélt lókuszt ábrázolja. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek.

#### 6.4.2. Többszörösen deléciós törzsek létrehozása

A már meglévő *hxnTΔ* és *hxnYΔ*, valamint a 6.4.1. pont alapján létrehozott új *hxnSΔ* törzs segítségével létrehoztuk a halmozottan deléciós mutánsokat.

A *hxnSΔ/hxnTΔ* dupla mutáns törzset egy lépésben végrehajtott delécióval hoztuk létre egy Double-Joint PCR módszerrel létrehozott *pabaA*<sup>+</sup> szelekciós marker gént hordozó szubsztitúciós kazetta transzformálásával (lásd a 6.4.2.1. alfejezetet).

A *hxnSΔ/hxnYΔ* dupla mutáns törzset a *hxnSΔ::pabaA*<sup>+</sup>, *pabaA1*, *riboB2* és *hxnYΔ::riboB*<sup>+</sup>, *riboB2*, *pabaA1* törzsek genetikai keresztezésével hoztuk létre (lásd a 6.4.2.2. alfejezetet).

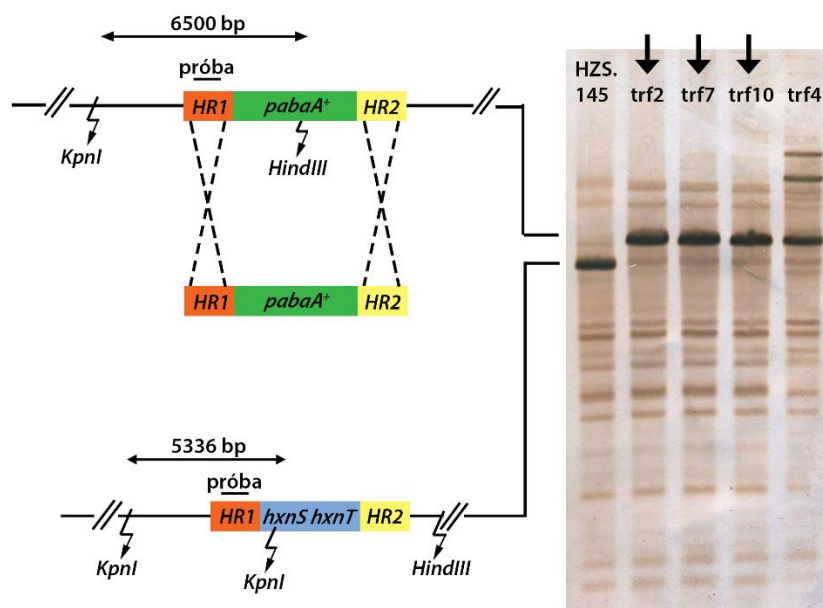
A *hxnTΔ/hxnYΔ* dupla mutáns törzset a *hxnTΔ::pabaA*<sup>+</sup>, *pabaA1*, *riboB2* és *hxnYΔ::riboB*<sup>+</sup>, *riboB2*, *pabaA1* törzsek genetikai keresztezésével hoztuk létre (lásd a 6.4.2.2. alfejezetet).

A *hxnSΔ/hxnTΔ/hxnYΔ* tripla mutáns törzset a *hxnShxnTΔ::pabaA*<sup>+</sup>, *pabaA1*, *riboB2* és *hxnYΔ::riboB*<sup>+</sup>, *riboB2*, *pabaA1* törzsek genetikai keresztezésével hoztuk létre (lásd a 6.4.2.3. alfejezetet).

#### 6.4.2.1. A *hxnS/hxnT* dupla deléció létrehozása

A *hxnS* és *hxnT* gének közvetlenül egymás mellett helyezkednek el a genomban, valamint közös promóter régióval rendelkeznek, mely megnehezítette a genommodosított *hxnSΔ* és *hxnTΔ* törzsek genetikai keresztezését, vagy az egyik törzs transzformálással történő újabb genommodosítását, ezért a mutáns létrehozását a *hxnS* és *hxnT* gének egy lépésben történő deléciójával oldottuk meg. A *hxnS* és *hxnT* egyedi deléciók szubsztitúciós kazettáinak létrehozásához felhasznált indítószekvenciák kombinálásával készítettünk egy olyan szubsztitúciós kazettát, amelynek segítségével a két gént egyszerre, a közös promóterrel együtt deletálhattuk. A felhasznált indítószekvenciákat a 4. melléklet tartalmazza. A deléciós törzs létrehozásához egy *pabaA1*, *riboB2*, *pyroA4* auxotróf *nkuAΔ* *A. nidulans* törzset használtunk (HZS.564) recipiens törzsként. Az *nkuAΔ* deléció előnyös egy rekombináción alapuló génmodosítási eljárás esetén, ugyanis nagyrészt az NkuA felelős a nem-homológ rekombinációs események létrejöttéért az *A. nidulans*-ban. Az NkuA hiányában a nem-homológ végek összekapcsolása nem hatékony, így az *nkuA* deléciójával a nem-homológ rekombinációs események gyakorisága minimálisra csökken, azaz nagyobb valószínűséggel kerülhető el transzformáláskor az ektopikus integráció eseménye (Nayak és mtsai., 2006). A transzformálást követően 33 para-amino-benzoesavra nézve prototróf transzformáns közül választottuk ki azt a 11 transzformánst, amelyek 6-NA nitrogénforrást tartalmazó táptalajon igen, de NA nitrogénforrást tartalmazó táptalajon nem voltak képesek növekedni. A „*hxnT* prom frw2” és „*hxnT* prom rev2” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR előszelekció alapján a transzformánsok közül négyet választottunk ki Southern analízisre. A Southern-hibridizálás három törzs esetében igazolta, hogy a deléciós kazetta csak egy kópiában integrálódott a genomba, melyek közül a *trf10* utódot (későbbiekben HZS.568) választottuk ki a további vizsgálatokhoz (18. ábra).





**18. ábra: A *hxnS/hxnT* gének együttes deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégia.**

A Double-Joint PCR eljárással létrehozott, *pabaA*<sup>+</sup> szekvenciát tartalmazó szubsztitúciós kazetta sémája az ábra bal oldalán látható. A narancssárga és sárga téglalapok a targetálást szolgáló, a genomi régióval homológ szakaszokat jelölik (HR1: a deletálás helyétől upstream irányba eső szekvencia, HR2: a deletálás helyétől downstream irányba eső szekvencia). A *hxnS*<sup>+</sup>/*hxnT*<sup>+</sup> a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét KpnI/HindIII enzimekkel emésztettük (a villám alakú nyilak a KpnI és a HindIII hasítóhelyeket jelölik). Hibridizációs próbának PCR eljárással (*hxnS* rup nest frw és *hxnS* rup rev indítószekvenciák, lásd 4. melléklet) felszaporított szekvenciát használtunk, melyet az ábrán „próba” névvel jelöltünk. A kettős nyilak a KpnI/HindIII-emésztésből származó termékek méretét jelölik. A jobb oldalon a Southern-hibridizációs membránt ábrázoltunk a *hxnS*<sup>+</sup>/*hxnT*<sup>+</sup> (HZS.145) és a vizsgált transzformáns törzsek hibridizációs jeleivel. Az alsó séma az intakt *hxnS/hxnT* lókuszt, a felső a kazetta beépülése esetén létrejövő *pabaA*<sup>+</sup> szelekciós markerrel kicserélt lókuszt ábrázolja. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek.

A létrehozott deléciós törzzsel végzett növekedési tesztek során a 6-NA nitrogénforrást tartalmazó táptalajon történő növekedést megfigyelve meglepő fenotípust tapasztaltunk (Ámon, 2018). A *hxnShxnTΔ* törzs sokkal erősebb növekedést mutatott 6-NA nitrogénforráson, mint a vad típusú kontroll (lásd, 6.6. alfejezet). Mivel önmagában a *hxnT* génre deléciós mutáns erősen csökkent növekedést mutatott 6-NA nitrogénforráson, így a *hxnS* és *hxnT* gének együttes deléciója esetén további csökkenést vártunk volna. A tapasztalt paradox fenotípus egyik magyarázata lehet az, hogy a két enzim egyidejű elvesztése egy olyan alternatív útvonalat aktiválhat, vagy egy eddig ismeretlen enzim túltermelődését indukálhatja, amely a 6-NA-at sokkal hatékonyabban képes hasznosítani. Az sem zárható ki, hogy a közös *hxnS-hxnT* promóter régió elvesztése az útvonal más génjeinek túlműködéséhez vezet. Ezt a lehetőséget támaszthatja alá, hogy korábbi munkánk során kimutattuk, hogy a katabolikus útvonalra specifikus HxnR transzkripciós faktor limitált mennyiségben termelődik indukció esetén (Ámon és mtsai., 2017). Annak érdekében, hogy kizárhassuk azt a lehetőséget, hogy a közös promóter régió elvesztése okozza a fenotípust, készítettünk egy olyan *hxnSΔ/hxnTΔ* dupla

mutáns törzset, amely esetében a 6.4.1. alfejezet alapján elkészített *hxnSA::pabaA<sup>+</sup>*, *pabaAI*, *riboB2* törzsbe (HZS.599) transzformáltunk egy *hxnT::riboB<sup>+</sup>* szubsztitúciós kazettát. A riboflavin és para-amino-benzoésav nélkül növekedni képes transzformánsok közül a „hxnS ReTi frw” és „hxnS ReTi rev”, valamint a „hxnT frw” és „hxnT rev” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR előszelekciót követően két transzformáns utódot választottunk ki qPCR-rel történő kópiaszám ellenőrzésre, mely alapján megállapítottuk, hogy mind a két transzformáns esetében csak egy kópiában épült be a genomba a szubsztitúciós kazetta. Az egykópiás integrációt hordozó transzformánsokon végzett növekedési teszt, melynek eredményét jelen értekezésben nem mutatjuk be, megerősítette a paradox növekedést, amit a promóterhiányos dupla mutánsnál tapasztaltunk. Azaz, a közös promóter régiót tartalmazó mutáns 6-NA-at tartalmazó táptalajon ugyanúgy a kontroll törzsnél erősebb növekedést mutatott, ahogyan azt a promótert nem tartalmazó HZS.568 dupla mutáns törzs esetében megfigyeltük. Eredményeink alapján tehát a fenotípust nem a közös promóter régió elvesztése okozza. A későbbiekben tovább fogjuk vizsgálni a jelenséget, hogy választ kapjunk a dupla mutáns törzs paradox növekedésére.

#### 6.4.2.2. A *hxnS/hxnY* és *hxnT/hxnY* dupla deléciók létrehozása

A *hxnSA/hxnYA* dupla deléciós mutáns keresztezéssel (5.7. alfejezet) történő előállításához a korábban létrehozott HZS.223 (*hxnYA::riboB<sup>+</sup>*, *riboB2*, *pabaAI*) és a HZS.548 (*hxnSA::pabaA<sup>+</sup>*, *pabaAI*, *anAI*, *riboB2*) törzseket használtuk fel. A *hxnY* gén esetében a deléció vad típusú *riboB<sup>+</sup>* génnel, a *hxnS* gén esetében pedig vad típusú *pabaA<sup>+</sup>* génnel történt. Mind a két törzs auxotrófiát hordozott a másik gén kiütéséhez használt vitamin auxotrófia marker génre nézve, amelynek következtében genetikai keresztezéskor csak a deléciós lókuszokban hordozott vad típusú marker gének egyszerre történő öröklődése biztosítja a riboflavint és para-amino-benzoésavat nem tartalmazó táptalajon történő növekedés képességét. A létrehozott dupla mutáns utódok közül egyet választottunk ki a további vizsgálatokhoz, melyet HZS.558-nak nevezünk el.

A *hxnTA/hxnYA* dupla mutáns törzset a HZS.222 (*hxnTA::pabaA<sup>+</sup>*, *pabaAI*, *riboB2*) és HZS.223 (*hxnYA::riboB<sup>+</sup>*, *riboB2*, *pabaAI*) törzsek genetikai keresztezésével hoztuk létre ugyanazt a szelekciós elgondolást követve, mint a fenti *hxnSA/hxnYA* mutáns létrehozásánál. A létrehozott dupla deléciós törzsek közül egyet választottunk ki a további kísérletekhez (HZS.502).



#### 6.4.2.3. *hxnS/hxnT/hxnY* deléció létrehozása

A 6.4.2.1. alfejezet alapján létrehozott HZS.568 törzs (*hxnShxnTΔ::pabaA<sup>+</sup>, pabaA1, pyroA4, riboB2, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>*) alkalmas volt arra, hogy a HZS.223 törzzsel (*hxnYΔ::riboB<sup>+</sup>, riboB2, pabaA1*) történő genetikai keresztezéssel (5.7. alfejezet) *hxnShxnTΔ/hxnYΔ* mutáns törzset hozzunk létre. Ahogyan a *hxnSΔ/hxnYΔ* mutáns létrehozásánál, ebben az esetben is direkt tudtunk szelektálni a kívánt utódokra riboflavint és para-amino-benzoésavat nem tartalmazó táptalajon. A létrehozott mutáns törzset HZS.569-nek neveztük el.

### 6.5. Az NDC2 és NDC3 gének deléciója

Az NDC2 és az NDC3 génjeinek delécióját is Double-Joint PCR módszerrel (Yu és mtsai., 2004) létrehozott szubsztitúciós kazetta riboflavin auxotróf (*riboB2*) recipiens törzsbe történő transzformálásával hajtottuk végre (5.6. alfejezet). Szelekciós markerként minden esetben a vad típusú *riboB<sup>+</sup>* gént használtuk. A 4. melléklet tartalmazza az indítószekvenciákat, amelyeket a konstrukciók elkészítéséhez használtunk. A létrehozott deléciós mutánsok minden esetben jól látható fenotípussal rendelkeztek a NA hasznosítási tesztekben (lásd 6.6. alfejezet). Így annak igazolására, hogy a deléciós törzsek fenotípusa valóban az adott gén deléciója miatt következett be és nem valamilyen előre nem tervezett, egyéb genomi változás miatt, nem az adott gén rekonstitúcióját végeztük el (a vad típusú gén visszajuttatása a deléciós törzsbe transzformálással), hanem a deléciós transzformáns törzsek genetikai keresztezésével kapott utódok vizsgálatával. Mivel a keresztezésekkor a szelekciós marker gén minden deléciós törzs esetében együtt szegregált a deléciós fenotípust eredményező genetikai változással, bizonyítottnak tekintettük, hogy a deléció okozza a megfigyelt fenotípust, így ennek igazolására már külön nem térünk ki.

A *hxnV* gén deléciójának létrehozásához egy *riboB2, pantoB100* auxotróf (HZS.267), valamint egy *riboB2, pyroA4* auxotróf *A. nidulans* törzset használtunk (TN02 A21). Riboflavinra nézve prototróf transzformánsokra szelektáltunk, amelyek közül a „*hxnV* AS frw” és „*hxnV* AS rev” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR alapú előszelekciót követően három transzformáns törzset választottunk ki Southern analízisre. Két transzformáns törzs (185/trf1, a továbbiakban HZS.294 és 185/trf2, a továbbiakban HZS.295) hordozta a cél lókuszbba integrált deléciós kazettát ektopikus integrációk nélkül, ezért a további vizsgálatokhoz ezeket a *hxnVΔ* törzseket használtuk (19. ábra, A panel).

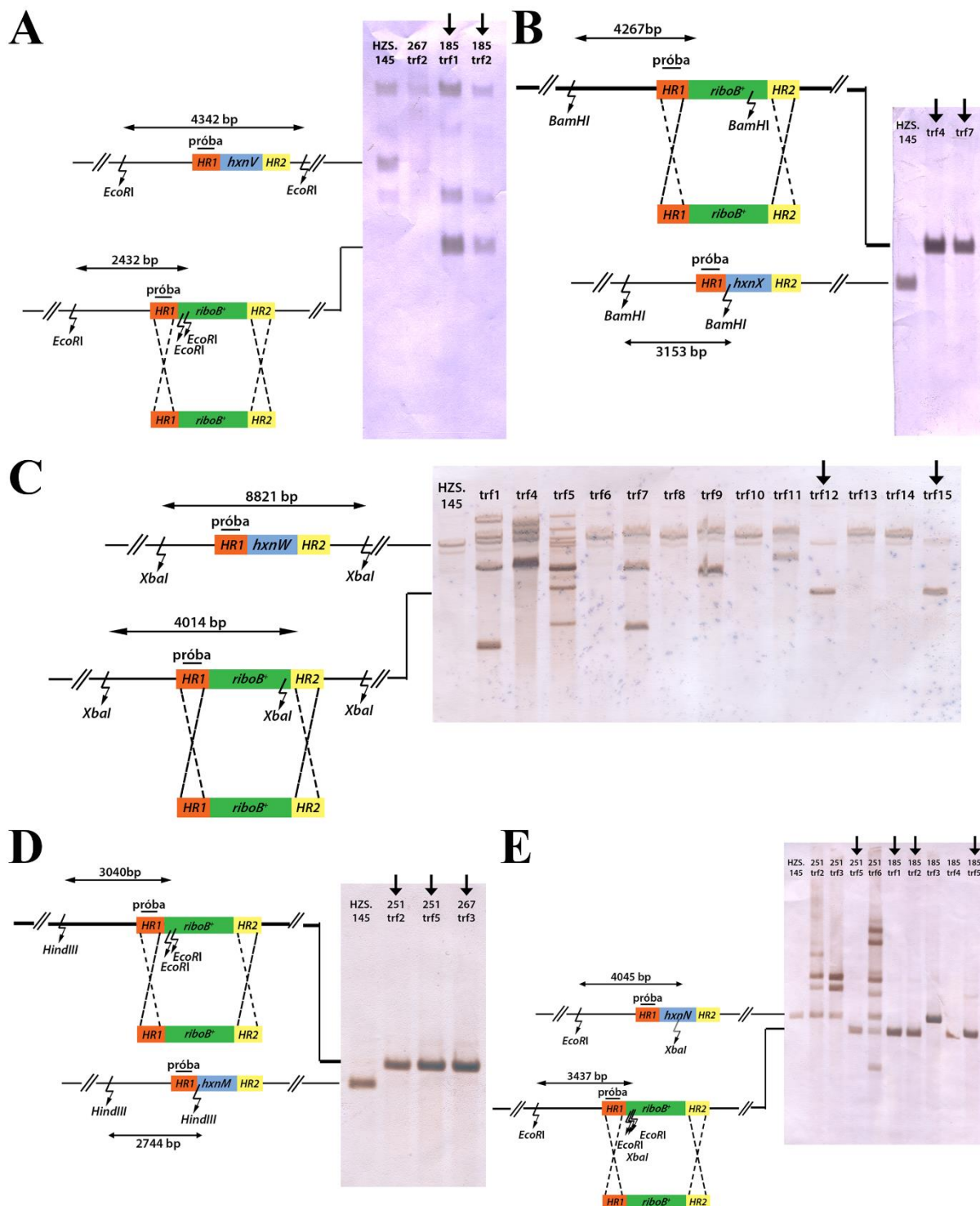
A *hxnX* gén deléciójának létrehozásához egy *riboB2, biA1, pabaA1* auxotróf *A. nidulans* törzset választottunk (HZS.251) recipiens törzsként. A nyolc, riboflavinra nézve prototróf

transzformáns közül két törzsben mutatkozott a *hxnX* gén hiánya a „*hxnX* frw” és „*hxnX* NotI rev” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR előszelekció során. Ezek Southern analízise kimutatta, hogy mind a két törzs esetében csak egy kópiában integrálódott a deléciós kazetta a genomba, a *hxnX* lokuszba (19. ábra, B panel). A két *hxnXΔ* törzset, a HZS.296 (trf4) és HZS.297 (trf7) törzseket használtuk fel a további kísérletek során.

A *hxnW* gén deléciójának létrehozásához egy *riboB2*, *pantoB100* auxotróf *A. nidulans* törzset alkalmaztunk (HZS.267) recipiens törzsként. A 15 riboflavinra nézve prototróf transzformáns közül 13 törzset választottunk ki Southern-hibridizációra a „*hxnW* AS frw” és „*hxnW* AS rev” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR előszelekció alapján, melyek közül két törzs esetében történt egykópiás integráció a cél lokuszba (19. ábra, C panel). A HZS.393 (trf12) és HZS.394 (trf15) *hxnWΔ* törzseket használtuk fel a további kísérletekben.

A *hxnM* gén deléciójának létrehozásához egy *riboB2*, *biA1*, *pabaA1* auxotróf (HZS.251), illetve egy *riboB2*, *pantoB100* auxotróf *A. nidulans* törzset (HZS.267) alkalmaztunk recipiens törzsként. Az öt HZS.251 eredetű riboflavin prototróf transzformáns közül kettő, a három HZS.267 riboflavin prototróf transzformáns közül pedig egy törzset választottunk ki Southern analízis céljára a „*hxnM* ReTi frw” és „*hxnM* ReTi rev” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR előszelekció alapján. Minden kiválasztott törzs egykópiás integrációt hordozott és a továbbiakban ezek a *hxnMΔ* törzsek, HZS.291 (251/trf2), HZS.292 (251/trf5) és HZS.293 (267/trf3) (19. ábra, D panel) képezték a kutatások további tárgyát.

A *hxnN* gén deléciójának létrehozásához egy *riboB2*, *biA1*, *pabaA1* auxotróf (HZS.251) és egy *riboB2*, *pyroA4* auxotróf (TN02 A21) *A. nidulans* törzset használtunk. A HZS.251 transzformálásból hat riboflavin prototróf transzformáns közül négy, a TN02 A21 transzformálásból hét riboflavin prototróf transzformáns közül pedig öt törzset választottunk ki Southern analízisre a „*hxnN* ReTi frw” és „*hxnN* ReTi rev” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR előszelekciót követően. Ezek közül négy utód hordozott egykópiás integrációt, a HZS.287 (251/trf5), HZS.288 (185/trf1), HZS.289 (185/trf2) és HZS.290 (185/trf5), melyeket a további kísérleteinkben használtunk fel (19. ábra, E panel).

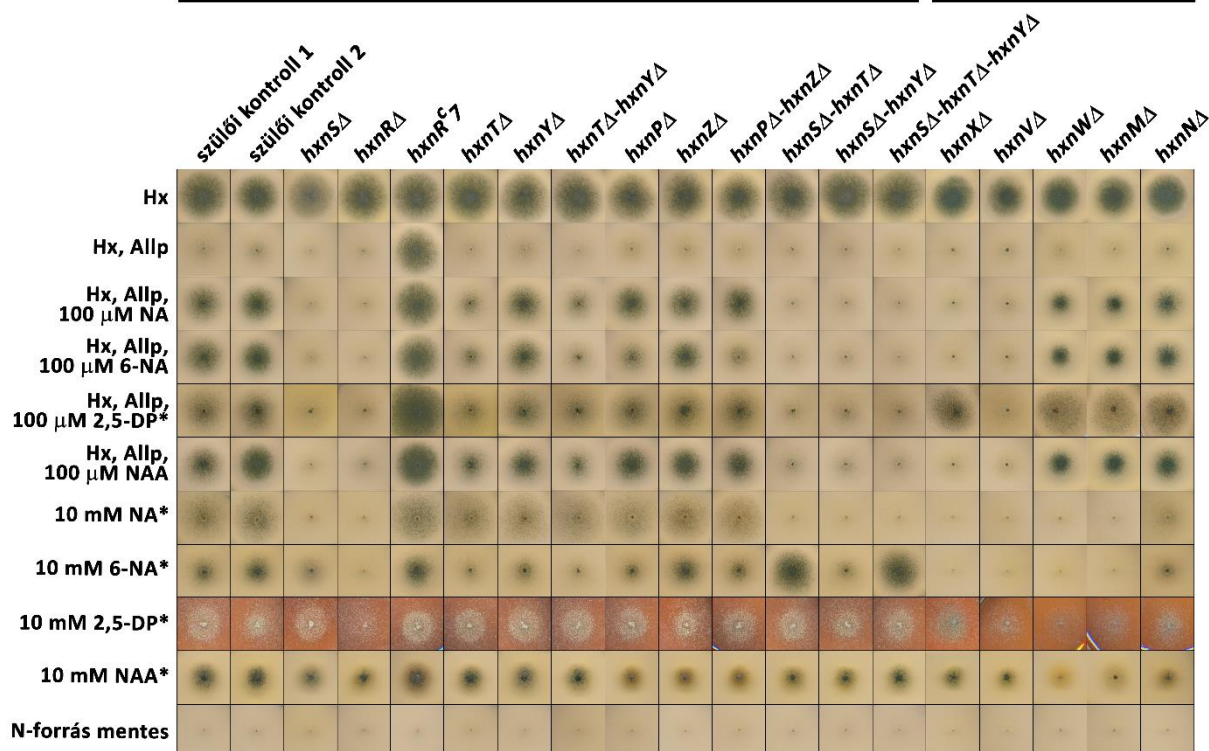


**19. ábra: Az NDC2 és NDC3 gének deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégiák.** A Double-Joint PCR eljárással létrehozott, *riboB*<sup>+</sup> szekvenciát tartalmazó szubsztitúciós kazetta sémája minden esetben a Southern-hibridizációs membránoktól balra látható. A narancssárga és sárga téglalapok a targetálást szolgáló, a genomi régióval homológ szakaszokat jelölik (HR1: a deletálás helyétől upstream irányba eső szekvencia, HR2: a deletálás helyétől downstream irányba eső szekvencia). A villám alakú nyilak a restriktációs enzimek hasítóhelyeit, a kettős nyilak pedig az emésztésből származó termékek méretét jelölik. A PCR eljárással előállított hibridizációs próbák pozícióját minden esetben „próba” névvel jelöltük. Az A, C és E panelek esetében a felső séma a vad típusú lókuszt, az alsó a kazetta beépülése esetén létrejövő *riboB*<sup>+</sup> szelekciós markerrel kicserélt lókuszt ábrázolja, a B és D panelek esetében pedig fordítva. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek. A Southern-hibridizációs membránokon a vad típusú törzs (HZS.145) és a vizsgált transzformáns törzsek hibridizációs jelei láthatóak. **A panel: A *hxnV* gén deléciójának ellenőrzésére**

**használt Southern-hibridizációs stratégia.** A *hxnV*<sup>+</sup> és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét EcoRI enzimmal emésztettük, a hibridizációs próbát *hxnV* upst nest frw és *hxnV* upst rev indítószekvenciákkal (lásd 4. melléklet) szaporítottuk fel. **B panel: A *hxnX* gén deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégia.** A *hxnX*<sup>+</sup> és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét BamHI enzimmal emésztettük, a hibridizációs próbát *hxnV* AS frw és *hxnV* down nest rev indítószekvenciákkal (lásd 4. melléklet) szaporítottuk fel. **C panel: A *hxnW* gén deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégia.** A *hxnW*<sup>+</sup> és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét XbaI enzimmal emésztettük, a hibridizációs próbát *hxnV* AS frw és *hxnW* upst rev indítószekvenciákkal (lásd 4. melléklet) szaporítottuk fel. **D panel: A *hxnM* gén deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégia.** A *hxnM*<sup>+</sup> és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét HindIII és EcoRI enzimekkel emésztettük, a hibridizációs próbát *hxnM* upst nest frw és *hxnM* upst rev indítószekvenciákkal (lásd 4. melléklet) szaporítottuk fel. **E panel: A *hxnN* gén deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégia.** A *hxnN*<sup>+</sup> és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét EcoRI és XbaI enzimmal emésztettük, a hibridizációs próbát *hxnN* upst nest frw és *hxnN* upst rev indítószekvenciákkal (lásd 4. melléklet) szaporítottuk fel.

## 6.6. Az NDC1, NDC2 és NDC3 génekre deléciós törzsek NA hasznosítási képességének vizsgálata

A létrehozott *hxnSΔ*, *hxnShxnTΔ*, *hxnSΔ/hxnYΔ*, *hxnShxnTΔ/hxnYΔ*, *hxnVΔ*, *hxnXΔ*, *hxnWΔ*, *hxnMΔ* és *hxnNΔ* deléciós törzsek (HZS.599, HZS.568, HZS.558, HZS.569, HZS.294, HZS.296, HZS.393, HZS.293, HZS.288), valamint a korábban laborunkban létrehozott *hxnRΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*, *hxnPΔ* és *hxnZΔ* (Ámon, 2018) törzsek növekedési képességét Hx diagnosztikus táptalajokon, valamint NA, 6-NA, 2,5-DP és NAA nitrogénforrásokon vizsgáltuk (20. ábra). Mivel a NA, 6-NA és 2,5-DP az útvonal köztes metabolitjai és más ismert nitrogénforrásokhoz képest (ammónium, nitrát, Hx, urea, acetamid, stb.) rendkívül rosszul hasznosulnak, megigyeztük a törzsek növekedési képességét hosszú, hét nap inkubációt követően is (nem mutatott adat). Ebben az esetben a *hxnWΔ* törzs kivételével egyik mutáns sem mutatott eltérő növekedési képességet. A *hxnWΔ* hosszú inkubációs idő esetén NA, 6-NA és 2,5-DP nitrogénforráson is úgynevezett „leaky” fenotípust mutatott.



**20. ábra: NDC1, NDC2 és NDC3 génekre deléciós törzsek növekedési képességének vizsgálata különböző nitrogénforrásokon.**

A „Hx” az 1mM Hx nitrogénforrást tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 100 μM NA” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 100 μM NA-at tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 100 μM 6-NA” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 100 μM 6-NA-at tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 100 μM 2,5-DP” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 100 μM 2,5-DP-t tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 100 μM NAA” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 100 μM nikotinamidot tartalmazó táptalajt, a „10 mM NA” a NA-at nitrogénforrásként tartalmazó táptalajt, a „10 mM 6-NA” a 6-NA-at nitrogénforrásként tartalmazó táptalajt, a „10 mM 2,5-DP” a 2,5-DP-t nitrogénforrásként tartalmazó táptalajt, a „10 mM NAA” a nikotinamidot nitrogénforrásként tartalmazó táptalajt, a „N-forrás mentes” pedig a nitrogénforrást nem tartalmazó táptalajt jelöli. A Hx nitrogénforrást tartalmazó és a nitrogénforrás nélküli táptalajokon három napig, a többi (csillaggal jelölt) táptalajon pedig négy napig növesztettük a törzseket 37 °C-on. Kontroll törzsek: szülői kontroll 1 (HXS.120), szülői kontroll 2 (TNO2 A21): az összes *hxn* gén tekintetében vad típusúak. Mutáns törzsek: *hxnSΔ* (HXS.599), *hxnRΔ* (HXS.136), *hxnR<sup>c7</sup>* (FGSC A872), *hxnTΔ* (HXS.222), *hxnYΔ* (HXS.223), *hxnTΔhxnYΔ* (HXS.502), *hxnPΔ* (HXS.221), *hxnZΔ* (HXS.226), *hxnPΔ/hxnZΔ* (HXS.480), *hxnShxnTΔ* (HXS.568), *hxnSΔ/hxnYΔ* (HXS.558), *hxnShxnTΔ/hxnYΔ* (HXS.569), *hxnVΔ* (HXS.294), *hxnXΔ* (HXS.296), *hxnWΔ* (HXS.393), *hxnMΔ* (HXS.293), *hxnNΔ* (HXS.288). A felhasznált törzsek teljes genotípusa az 1. mellékletben található meg.

Mielőtt kitérnénk a deléciós törzsek nitrogénforrás hasznosítási eredményének elemzésére, röviden bemutatjuk a Hx diagnosztikus táptalajok használatának okát. A Hx táptalajt diagnosztikus táptalajnak nevezzük, ugyanis abban az esetben, ha Allp-lal gátoljuk a PHI enzim aktivitását, az egyedüli nitrogénforrásként adagolt Hx hasznosítása csak a HxnS enzim működésén múlik, amely azonban NA származék inducer nélkül nem termelődik meg. A Hx+Allp és Hx+Allp+1 mM NA táptalajon történő telepképzésből tehát két információt kapunk a NA katabolikus útvonalról. Az egyik az, hogy képződik-e HxnS enzim, a másik pedig

az, hogy aktiválódik-e a NA lebontási útvonal. Vad típusú törzs esetén ez utóbbi feltétele az előbbinek. Itt érdemes megjegyezni azt, hogy a NA katabolizmus indukere nem a NA, vagy a 6-NA, hanem egy, a NA lebontása során képződő későbbi köztes metabolit. Tehát a táptalaj tesztek során a NA akkor indukálja a HxnR-en keresztül a katabolikus útvonalat, ha működnek azok az enzimek, amelyek a valódi inducer metabolithoz vezetnek. Ha akár egy enzim hiányzik a rendszerből, amely a valódi inducer képződéséhez szükséges, akkor annak hiányában a NA lebontási útvonal egyik génje sem aktiválódik, a *hxnS* sem (Ámon és mtsai., 2017) (jelen dolgozatban a 7. és 9. ábrán látható transzkriptum analízis, nem indukált körülmények). A NA, 6-NA, 2,5-DP és NAA (még 100  $\mu$ M mennyiségben is, lásd 20. ábra) képes indukálni a hasznosítási útvonalat (az inaktívan jelen levő HxnR aktiválásával; Ámon és mtsai., 2017), ezért ha a táptalajban Hx a nitrogénforrás, és Allp-lal van kiegészítve, akkor inducer jelenlétében a megtermelő HxnS elvégzi a Hx xantinná alakítását.

Az a tény, hogy a *hxnVA* és a *hxnXA* törzs nem képes nőni Allp-lal kiegészített Hx nitrogénforráson egyik inducer jelenlétében sem, a *hxnMA*, *hxnNA* és *hxnWA* törzsek azonban igen, arra enged következtetni, hogy a HxnM, HxnN és HxnW a lebontási útvonal valódi inducerének termelődését követő lépésekért lehetnek felelősek, míg a HxnV és a HxnX a valódi inducertől „upstream” vesznek részt az lebontásban. Azonban ha figyelembe vesszük a *hxnWA* törzs NA, 6-NA és 2,5-DP nitrogénforrásokon tapasztalt „leaky” fenotípusát, akkor át kell értékelnünk a HxnW pozícióját az útvonalban. A *hxnWA* Hx diagnosztikus tesztek során megfigyelt növekedése azzal magyarázható, hogy a HxnW a *hxnYA* és *hxnTA* törzsek növekedési tesztje alapján előre jelzett alternatív útvonalon (Ámon, 2018) vesz részt a lebontásban, így lehetséges, hogy a valódi inducer képződéséhez hozzájárul, de nem nélkülözhetetlen hozzá.

NA és 6-NA nitrogénforráson a *hxnXA*, a *hxnVA* és a *hxnMA* mutánsok egyike sem, a *hxnVA* és a *hxnXA* pedig még Hx diagnosztikus táptalajon sem képes nőni. Ez arra utalhat, hogy ezen gének termékei a vizsgált NA származékoktól downstream vesznek részt a lebontásban, és mivel a HxnX és a HxnV enzimeket az útvonalban egymás után véljük működni, valószínű, hogy a HxnX és HxnV-től downstream, de a HxnM előtt képződik a valódi inducer. 2,5-DP nitrogénforráson a *hxnVA* és *hxnMA* törzsek nem képeznek telepet (negatív kontrollként a *hxnRA* törzs növekedését kell figyelembe venni), a *hxnXA* törzs vad típusú növekedést mutat, míg a *hxnNA* törzs határozottan, de a vad típushoz képest redukált mértékben képes nőni (20. ábra). Az, hogy a *hxnXA* mutáns képes növekedni 2,5-DP nitrogénforráson igazolja az *in silico* vizsgálatok eredményét, miszerint a HxnX 6-NA-ból 2,5-DP-t képezhet. Amennyiben a 2,5-DP nitrogénforráson kapott növekedési teszteket együtt vizsgáljuk a diagnosztikus Hx tesztekkel

(ahol a *hxnVA* mutáns nem volt képesek növekedni), akkor a NA-at, 6-NA-at, vagy 2,5 DP-t tartalmazó táptalajokon a *hxnVA* mutáns növekedésének a hiánya egyértelműen arra utal, hogy a HxnV a 2,5-DP-től downstream helyezkedik el és az útvonal valódi inducere ebben a mutánsban nem jön létre. Ha a valódi inducer hiányában marad el a *hxnVA* növekedése a diagnosztikus táptalajon, akkor amennyiben a valódi inducerképződés hiányát kiküszöböljük a deléciók konstitutív *hxnR* (*hxnR<sup>c</sup>*) genetikai háttérbe helyezéssel, akkor igazoljuk állításunkat (lásd 6.7. alfejezet).

A *hxnNA* törzs NA, 6-NA és 2,5-DP nitrogénforrásokon bár képes növekedni, de csak redukáltan, ami azt jelzi, hogy nem a HxnN az egyedüli amidáz enzim, amely a végső NA származék amid csoportjának lehasítását végzi.

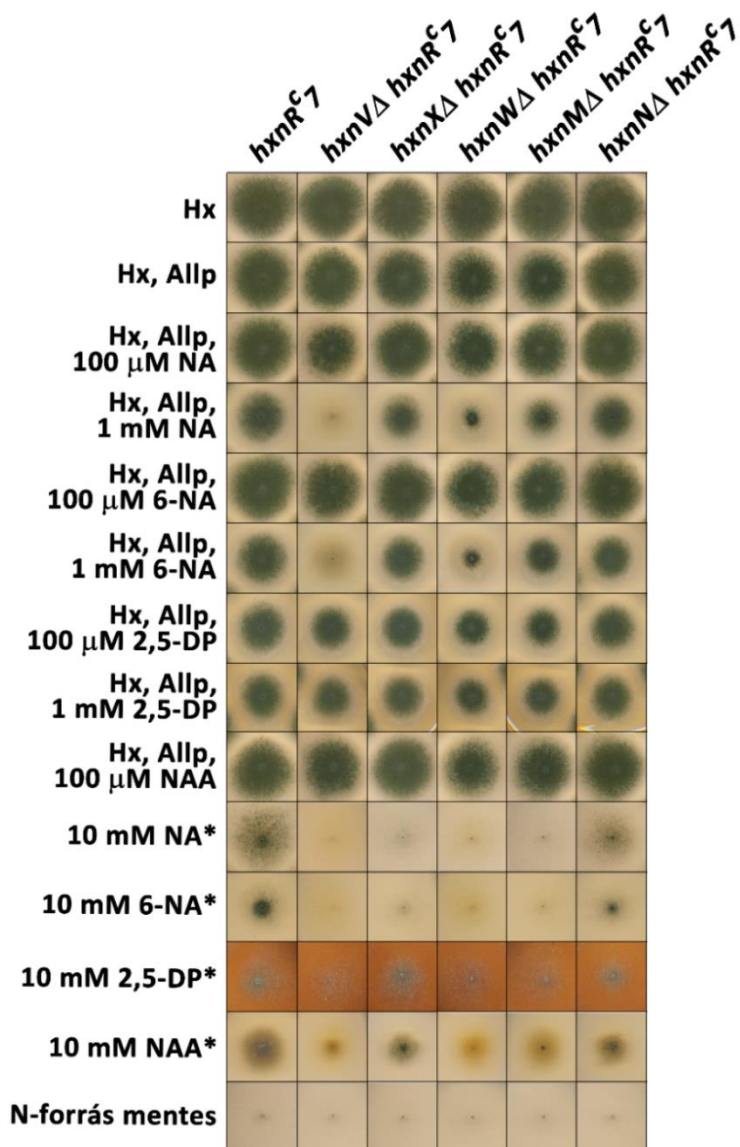
## **6.7. A deléciós törzsek konstitutív *hxnR* (*hxnR<sup>c</sup>*) háttérbe történő keresztezése NA származék hasznosítási tesztekhez és analitikai vizsgálatokhoz történő mintakészítés céljából**

A NA származék hasznosítási vizsgálatok során az inducerképződés kérdésének kiiktatásához, valamint GC-MS és HPLC-MS vizsgálatokra alkalmas minták előállításához a létrehozott összes *hxn* deléciót konstitutív *hxnR* (*hxnR<sup>c</sup>*) háttérbe kellett juttatnunk. A *hxnR<sup>c</sup>* jelenléte nem csak függetleníti az útvonalat az inducer metabolit képződésétől, de az útvonal génjeinek kifejeződése is sokkal nagyobb mértékű, amely jól látható a konstitutív mutáns (*hxnR<sup>c</sup>7*) NA származékokon mutatkozó erőteljesebb növekedésén (20. ábra). A *hxnR<sup>c</sup>* háttérű mutánsokban jobban akkumulálódnak a metabolikus köztestermékek, mint a *hxnR<sup>+</sup>* törzsben. A *hxnVA* (HZS.294), *hxnMA* (HZS.293) és *hxnNA* (HZS.288) törzseket az FGSC A872 *hxnR<sup>c</sup>7* törzsszel, a *hxnXA* (HZS.296) törzset a HZS.316 *hxnR<sup>c</sup>7* törzsszel, a *hxnWA* (HZS.394) törzset pedig a HZS.307 *hxnR<sup>c</sup>7* törzsszel kereszteztük és minden esetben a *hxn* deléciót és *hxnR<sup>c</sup>7* allélt kombinálva hordozó utódokat választottuk ki a további vizsgálatokhoz.

### **6.7.1. Deléciós *hxnR<sup>c</sup>* törzsek növekedésének vizsgálata**

A létrehozott deléciós *hxnR<sup>c</sup>7* háttérű *hxnVA*, *hxnXA*, *hxnWA*, *hxnMA* és *hxnNA* dupla mutánsok (HZS.309, HZS.310, HZS.517, HZS.308, HZS.306) növekedési képességét vizsgáltuk különböző NA származék nitrogénforrásokon és a diagnosztikus Hx táptalajokon (21. ábra).





21. ábra: NDC2 és NDC3 génekre deléciós *hxnR<sup>c7</sup>*, valamint *hxnTA* és *hxnYA hxnR<sup>c7</sup>* törzsek növekedési tesztje különböző nitrogénforrásokon.

A „Hx” az 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 100 μM NA” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 100 μM NA-at tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 1 mM NA” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 1 mM NA-at tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 100 μM 6-NA” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 100 μM 6-NA-at tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 1 mM 6-NA” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 1 mM 6-NA-at tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 100 μM 2,5-DP” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 100 μM 2,5-DP-t tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 1 mM 2,5-DP” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 1 mM 2,5-DP-t tartalmazó táptalajt, a „Hx, Allp, 100 μM NAA” az 5,5 μM Allp gátlószerrel kiegészített, 1 mM Hx nitrogénforrást tartalmazó, indukálószerként 100 μM nikotinamidot tartalmazó táptalajt, a „10 mM NA” a NA-at nitrogénforrásként tartalmazó táptalajt, a „10 mM 6-NA” a 6-NA-at nitrogénforrásként tartalmazó táptalajt, a „10 mM 2,5-DP” a 2,5-DP-t nitrogénforrásként tartalmazó táptalajt, a „10 mM NAA” a nikotinamidot nitrogénforrásként tartalmazó táptalajt, a „N-forrás mentes” pedig a nitrogénforrást nem tartalmazó táptalajt jelöli. A Hx nitrogénforrást tartalmazó és a nitrogénforrás nélküli táptalajokon három napig, a többi (csillaggal jelölt) táptalajon pedig négy napig növesztettük a törzseket 37 °C-on. Kontroll törzs: *hxnR<sup>c7</sup>* (FGSC A872). Mutáns törzsek: *hxnVΔ hxnR<sup>c7</sup>* (HVS.309), *hxnXΔ hxnR<sup>c7</sup>* (HVS.310), *hxnWΔ hxnR<sup>c7</sup>* (HVS.517), *hxnMΔ hxnR<sup>c7</sup>* (HVS.308), *hxnNΔ hxnR<sup>c7</sup>* (HVS.306). A felhasznált törzsek teljes genotípusa megtalálható az 1. mellékletben.

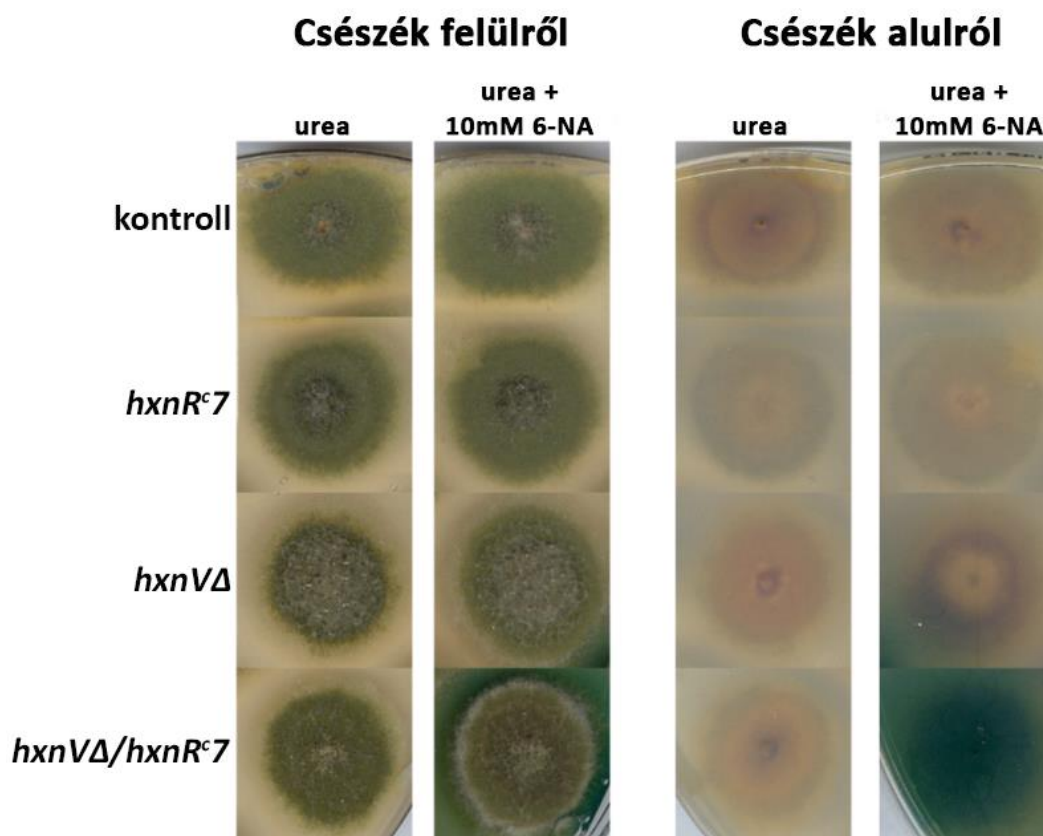


A *hxnR<sup>c7</sup>* háttérben a HxnR transzkripció faktor inducertől független, folytonosan aktív konformációja és autoregulációja következtében történő konstitutív kifejeződése (Ámon és mtsai., 2017) miatt elméletileg az összes vizsgált *hxn* mutánsnak nőnie kellett volna mind az inducer nélküli, mind pedig az inducert tartalmazó Hx diagnosztikus táptalajokon. A 100  $\mu$ M inducerrel kiegészített Hx diagnosztikus táptalajokon az összes *hxn* deléciós mutáns, a vártnak megfelelően, a vad típusú törzzsel megegyező és az inducert nem tartalmazó Hx diagnosztikus táptalajon mutatott mértékben tudott növekedni. Az 1 mM koncentrációban alkalmazott inducer esetén azonban a diagnosztikus Hx táptalajon a *hxnV $\Delta$  hxnR<sup>c7</sup>* (HZS.309) és *hxnW $\Delta$  hxnR<sup>c7</sup>* (HZS.517) törzsek a várttól eltérően viselkedtek (21. ábra). A *hxnV $\Delta$  hxnR<sup>c7</sup>* törzs növekedési képessége 1 mM NA és 6-NA jelenlétében teljesen elmarad, a *hxnW $\Delta$  hxnR<sup>c7</sup>* törzs esetén pedig csökkenést mutat (21. ábra) annak ellenére, hogy inducer nélkül (a konstitutív HxnR miatt elvárt módon) a Hx+Allp táptalajon még képesek nőni. Ez alapján a táptalajhoz adagolt inducer anyag tehető felelőssé a növekedés elmaradásáért, illetve redukciójáért. Úgy gondoljuk, hogy a *hxnR<sup>c7</sup>* háttérű mutánsban a köztes metabolit túlzott mértékben felszaporodva toxikus a gomba számára, de az is elképzelhető, hogy a konstitutívan aktív HxnR transzkripció faktort inaktiválja. NA és 6-NA nitrogénforráson a *hxnR<sup>c7</sup>* háttérű *hxnX $\Delta$* , *hxnV $\Delta$* , *hxnW $\Delta$*  és *hxnM $\Delta$*  törzsek nem képesek növekedni, ami inkább a 10 mM szubsztrátból keletkező toxikus anyagfelhalmozásra (vagy a HxnR inaktivációjára) utal, semmint arra, hogy a géntermékek minden esetben a lebontási útvonal elágazás nélküli ágán játszanának szerepet.

A *hxnR<sup>c7</sup> hxnN $\Delta$*  törzs az eddigi eredményeinkkel összhangban redukált módon képes növekedni 10 mM NA-on, valamint 10 mM 6-NA-on (20-21. ábra)

### 6.8. A *hxnV $\Delta$ hxnR<sup>c7</sup>* törzs esetén felhalmozódó kék pigment vizsgálata

Bakteriális NA lebontási útvonalak esetén több típusú prokarióta útvonalnál előfordul, hogy a 6-NA-at követő di-hidroxilált köztestermékből (2,5-DP, vagy 2,6-DNA) valószínűsíthetően egy tri-hidroxilált piridin metabolikus köztesterméken keresztül nem-enzimatisz módon kék színű azakinon pigment képződik (Boyer & Kruger, 1957). Megfigyeltük, hogy abban az esetben, ha a *hxnV $\Delta$  hxnR<sup>c7</sup>* mutánst (HZS.309) 5 mM urea nitrogénforrás mellett 10 mM NA-at, vagy 10 mM 6-NA-at tartalmazó táptalajon tenyésztjük, akkor 3-4 nap elteltével a telep körül a táptalaj kékesre színeződik (22. ábra).



**22. ábra: A *hxnVΔ hxnR<sup>c7</sup>* mutáns növekedési tesztje.**

Bal oldalon urea nitrogénforrást tartalmazó, jobb oldalon pedig urea nitrogénforrás mellett 10 mM 6-NA-at tartalmazó táptalajon végzett növekedési teszt látható. wt: HZS.145, *hxnR<sup>c7</sup>*: HZS.219, *hxnVΔ*: HZS.294, *hxnVΔ hxnR<sup>c7</sup>*: HZS.309.

Ez a jelenség analóg a prokariótáknál megfigyelttel. Jelenleg zajlanak a kék pigment azonosítását célzó GC-MS vizsgálatok, amelyekbe a *hxnVΔ hxnR<sup>c7</sup>* mutáns tenyésztése mellett izolált kék pigmentek mellett a *P. putida* NicX mutáns által termelt kék színű pigmenteket is bevontuk. Ha a kék pigment szerkezeti képletét nem is sikerül megfejtenünk, akkor legalább azt meg tudjuk állapítani, hogy az *A. nidulans* kék pigmentje azonos-e a bakteriális kék pigmenttel. Az analitikai kísérleteket és az adatok kiértékelését az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék analitikai laborjának munkatársa, Dr. Varga Mónika végzi.

#### 6.8.1. A kék pigment képződésének vizsgálata halmozottan deléciós mutánsokban

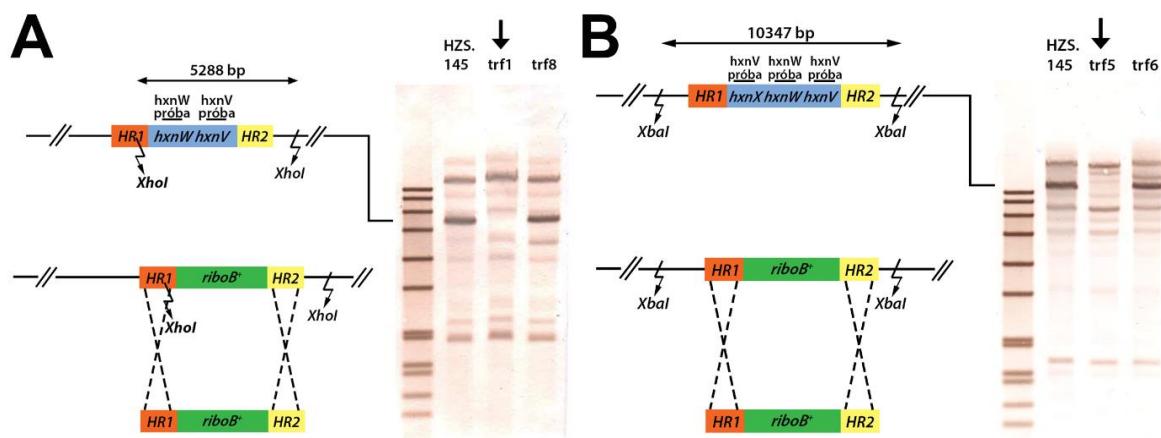
Annak érdekében, hogy azonosítsuk a kék pigment képződése előtt működő enzimeket, a *hxnV* deléciót különböző *hxn* deléciókkal kombináltuk *hxnR<sup>c</sup>7* genetikai háttérben, majd a kombinált deléciós törzsekben megvizsgáltuk a pigment termelődést.

A *hxnYΔ/hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* és *hxnTΔ/hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* dupla deléciós mutánsokat a HZS.429 (*hxnYΔ::riboB<sup>+</sup>, riboB2, pabaA1, biA1, hxnR<sup>c</sup>7*) és HZS.309 (*hxnVΔ::riboB<sup>+</sup>, riboB2, pyroA4, hxnR<sup>c</sup>7*), valamint a HZS.427 (*hxnTΔ::pabaA<sup>+</sup>, anA1, hxnR<sup>c</sup>7*) és HZS.537 (*hxnVΔ::riboB<sup>+</sup>, riboB2, pabaA1, hxnR<sup>c</sup>7*) törzsek keresztezésével (5.7. alfejezet) hoztuk létre.

A *hxnYΔ/hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* esetében azonos szelekciós marker génnel (*riboB<sup>+</sup>*) történtek a géndeléciók, ezért az utódok közül a „*hxnY frw*” és „*hxnY ReTi rev*”, valamint a „*hxnV AS frw*” és „*hxnV AS rev*” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR alapú szelekcióval választottuk ki a mind a két génre nézve deléciós törzseket. A létrehozott törzsek közül egyet (pr3) választottunk ki a vizsgálatokhoz, melyet HZS.747-nek neveztünk el.

A *hxnTΔ/hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* törzs esetében a *hxnT* gén deléciója a vad típusú *pabaA<sup>+</sup>* génnel, a *hxnV* gén deléciója pedig vad típusú *riboB<sup>+</sup>* génnel történt. Mivel csak a *hxnTΔ::pabaA<sup>+</sup>* delécióra tudtunk direkt szelekciót végrehajtani, a *hxnV* deléció esetében a „*hxnV AS frw*” és „*hxnV AS rev*” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR alapú szelekció segítségével választottuk ki a megfelelő dupla deléciós mutánsokat. A létrehozott törzsek közül egyet (pr1) választottunk ki a további vizsgálatokhoz, melyet HZS.748-nak neveztünk el.

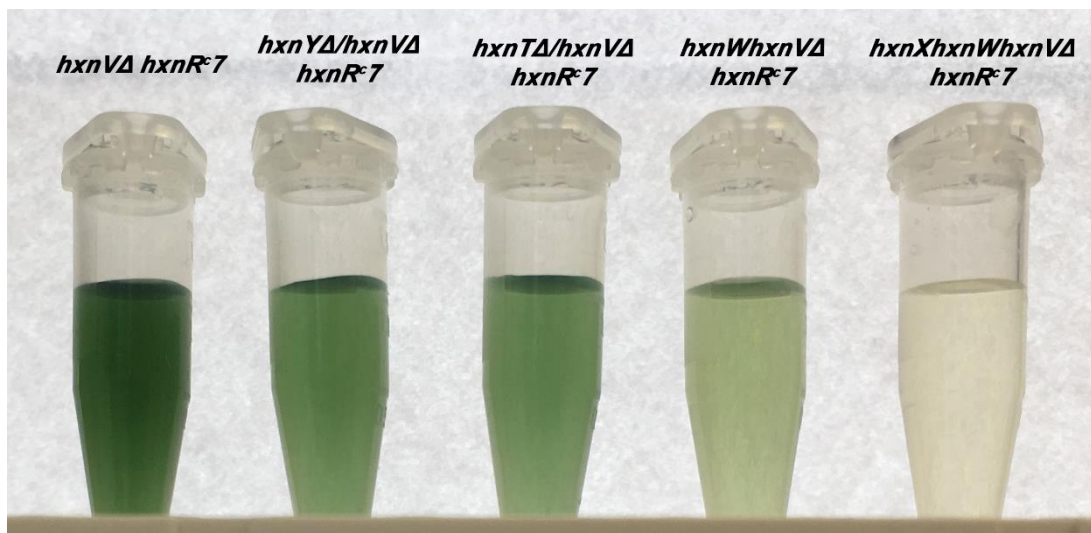
A *hxnWhxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* és a *hxnXhxnWhxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* törzsek létrehozásához a gének közelsége miatt nem genetikai keresztezést, hanem géndeléciót alkalmaztunk. A deléciós kazettákat az egyedi deléciók szubsztitúciós kazettáinak készítése során alkalmazott indítószekvenciák kombinálásával (4. melléklet) hoztuk létre. Mindkét esetben *riboB<sup>+</sup>* szelekciós marker gént építettünk a kazettákba és azokat egy *riboB2, pantoB100 hxnR<sup>c</sup>7* recipiens törzsbe (HZS.404) transzformáltuk. A 25 (*hxnWhxnVΔ*) és 38 (*hxnXhxnWhxnVΔ*) riboflavinra nézve prototróf transzformánsok *hxnWhxnVΔ* esetében a „*hxnV AS frw*” és a „*hxnW AS rev*”, *hxnXhxnWhxnVΔ* esetében pedig a „*hxnV AS frw*” és „*hxnX ReTi rev*” indítószekvenciákkal (4. melléklet) hajtottunk végre PCR előszelekciót. Két-két transzformáns törzset választottunk ki Southern analízisre, melyekből egy-egy esetben integrálódott a deléciós kazetta egy kópiában a genomba (23. ábra). A *hxnWhxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* esetében a *trf1* utódot (23. ábra, A panel), a *hxnXhxnWhxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* esetében pedig a *trf5* utódot (23. ábra, B panel) választottuk ki a vizsgálatokhoz, melyeket HZS.749-nek és HZS.750-nek neveztünk el.



**23. ábra: Az *hxnWhxnV* és a *hxnXhxnWhxnV* deléciók ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégiák.**

A Double-Joint PCR eljárással létrehozott, *riboB*<sup>+</sup> szekvenciát tartalmazó szubsztitúciós kazetta sémája minden esetben a Southern-hibridizációs membránoktól balra látható. A narancssárga és sárga téglalapok a targetálást szolgáló, a genomi régióval homológ szakaszokat jelölik (HR1: a deletálás helyétől upstream irányba eső szekvencia, HR2: a deletálás helyétől downstream irányba eső szekvencia). A villám alakú nyilak a restriktions enzimek hasítóhelyeit, a kettős nyilak pedig az emésztésből származó termékek méretét jelölik. Mind a két esetben gén-specifikus hibridizációs próbákat alkalmaztunk, így a deléciós mutánsok esetén nem kaptunk hibridizációs jelet. A PCR eljárással előállított génjelölt hibridizációs próbák pozícióját „hxnX próba”, „hxnW próba” és „hxnV próba” nevekkkel jelöltük. A felső séma a vad típusú lókuszt, az alsó pedig a kazetta beépülése esetén létrejövő *riboB*<sup>+</sup> szelekciós markerrel kicserélt lókuszt ábrázolja. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek. A Southern-hibridizációs membránokon a vad típusú törzs (HZS.145) és a vizsgált transzformáns törzsek hibridizációs jelei láthatóak. **A panel: A *hxnWhxnV* deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégia.** A vad típusú törzs és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét XhoI enzimmal emésztettük, a *hxnW* génjelölt hibridizációs próbát hxnW AS frw és hxnW AS rev, a *hxnV* génjelölt hibridizációs próbát pedig hxnV AS frw és hxnV AS rev indítószekvenciákkal (lásd 4. melléklet) szaporítottuk fel. **B panel: A *hxnXhxnWhxnV* deléciójának ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégia.** A vad típusú törzs és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét XbaI enzimmal emésztettük, a *hxnX* génjelölt hibridizációs próbát hxnX down frw és hxnW down rev, a *hxnW* génjelölt hibridizációs próbát hxnW AS frw és hxnW AS rev, a *hxnV* génjelölt hibridizációs próbát pedig hxnV AS frw és hxnV AS rev indítószekvenciákkal (lásd 4. melléklet) szaporítottuk fel.

A létrehozott halmozottan deléciós mutánsokat és a *hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* mutánt (HZS.309) előbb 16 órás inkubációval neutrális acetamid nitrogénforráson neveltük fel, majd a micéliumokat szűrést követően áthelyeztük 10 mM 6-NA szubsztrátot tartalmazó tápoldatba, és további 24 órán át inkubáltuk őket. A szilárd táptalajon a *hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* törzsben kék színűnek mutató pigment a tápoldatban zöld színű volt. A színváltozásnak valószínűleg a tápközeg pH eltéréséhez lehet köze, amelyet részletesen a későbbiek során fogunk vizsgálni. Mivel csak a *hxnX* deléció akadályozta meg a pigment képződését (24. ábra), ezzel kísérletesen bizonyítottuk, hogy a HxnX a HxnV előtt működik az útvonalban, ahogy azt már a korábbiakban is feltételeztük.



**24. ábra: A pigment képződésének vizsgálata a létrehozott halmozottan deléciós mutánsokban.**

A mutánsokat 16 órán át neutrális acetamid nitrogénforráson neveltük, majd a micéliumokat szűrést követően áthelyeztük 10 mM 6-NA szubsztrátot tartalmazó tápoldatba, és további 24 órán át inkubáltuk őket. A micéliumok szűrését követően 1 ml tápoldatokat mértünk ki eppendorf csőbe a pigmentáltság dokumentálására.

Törzsek: *hxnVA hxnR<sup>c7</sup>* (HZS.309), *hxnYA/hxnVA hxnR<sup>c7</sup>* (HZS.747), *hxnTA/hxnVA hxnR<sup>c7</sup>* (HZS.748), *hxnWhxnVA hxnR<sup>c7</sup>* (HZS.749), *hxnXhxnWhxnVA hxnR<sup>c7</sup>* (HZS.750).

## 6.9. Az útvonal intracelluláris színterének vizsgálata GFP-fúziós törzsek létrehozásával és vizsgálatával

Célunk, hogy mind a 11 *hxn* gén esetében megvizsgáljuk a kódolt fehérje intracelluláris lokalizációját GFP fúziós törzsek létrehozása és vizsgálata révén. *In silico* lokalizációs szignál keresést (5.12.2. alfejezet) hajtottunk végre minden *hxn* géntermék esetén, és az eredmények alapján két Hxn fehérjénél feltételezhetünk kompartmentalizációt. A HxnR, az útvonal transzkripció faktora, nukleáris lokalizációs szignált (NLS) és nukleáris export szignált (NES) hordoz (Ámon és mtsai., 2017), amely alapján feltételezhető a fehérje sejtmagi lokalizációja. A HxnR lokalizációjának vizsgálata Ámon Judit PhD munkájának (Ámon, 2018) részeként nem képzí tárgyat a jelen értekezésnek.

A másik fehérje, amely esetén kompartmentalizációt feltételezhetünk az elemzések alapján, a HxnX. A C-terminálison azonosított klasszikus peroxisómás lokalizációs szignál (PTS) szekvencia (SRL) erős indikációt jelentett arra nézve, hogy a fehérje a peroxisómákban lokalizálódik.

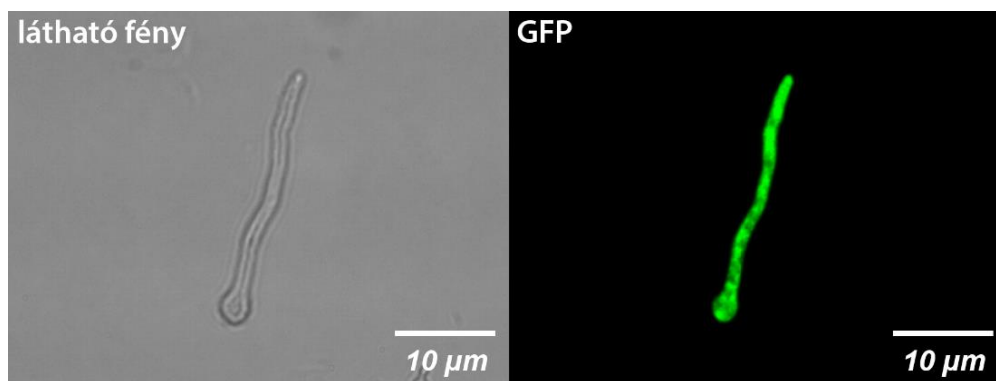
A HxnP és HxnZ fehérjék transzporterek, ezért esetükben membrán lokalizációt feltételezhetünk, amely lehet a citoplazma membránja, vagy valamely intracelluláris kompartment membránja (pl. peroxisóma, vakuólum, stb.).

A többi *hxn* géntermék esetében a szignál kereső programok negatív eredményei alapján nem feltételezünk kompartmentalizációt. A citoplazmában, esetleg a vakuólumokban váránk a megjelenésüket.

Jelen dolgozatban a HxnX lehetséges peroxiszómás lokalizációját, valamint a HxnV feltételezett citoplazmás lokalizációját vizsgáljuk GFP fúziós konstrukciók létrehozásával és deléciós befogadó törzsben történő kifejeztetésével. A jövőben minden további Hxn fehérjére ki kívánjuk terjeszteni az intracelluláris lokalizáció vizsgálatát.

#### 6.9.1. A *hxnV-gfp* fúziós konstrukciót kifejező törzs létrehozása

Az 5.11.1. alfejezetben részletesen leírtak alapján létrehoztunk egy *hxnV-gfp* fúziós fehérjét expresszáló és *pantoB*<sup>+</sup> szelektációs marker gént hordozó kazettát („*pantoB*<sup>+</sup> *hxnV-gfp* fúziós kazetta”, amelyben a prolin által indukálható *prnD* promóterről expresszálódik a fúziós gén), melyet egy *pantoB100* (pantoténsav auxotróf) *hxnVA* törzsbe (HZS.304) transzformáltunk. A transzformánsok közül 27 volt képes növekedni pantoténsav nélkül, amelyek közül az előzetes mikroszkópos vizsgálatok alapján hét transzformáns bizonyult megfelelőnek. Ezek közül qPCR segítségével megállapítottuk, hogy a HZS.304 trf25 transzformánsba egy kópiában épült be a konstrukció. Ezt az utódot HZS.555-nek neveztük el és ezt használtuk a mikroszkópos vizsgálatokhoz. Az eredmények alapján nem állíthatjuk, hogy a fehérje a citoplazmában, vagy valamely membránnal körülhatárolt kompartmentben lokalizálódik (25. ábra), mivel a GFP jel változó méretű vezikulumokba koncentrálnak. A jövőben Western-blot analízissel vizsgáljuk meg a fúziós HxnV-GFP fehérje stabilitását, ugyanis elképzelhető, hogy a vizsgálatoknál látható GFP jel a fúziós fehérje degradálódása miatt a vakuólumokban történő felhalmozódásból adódik.



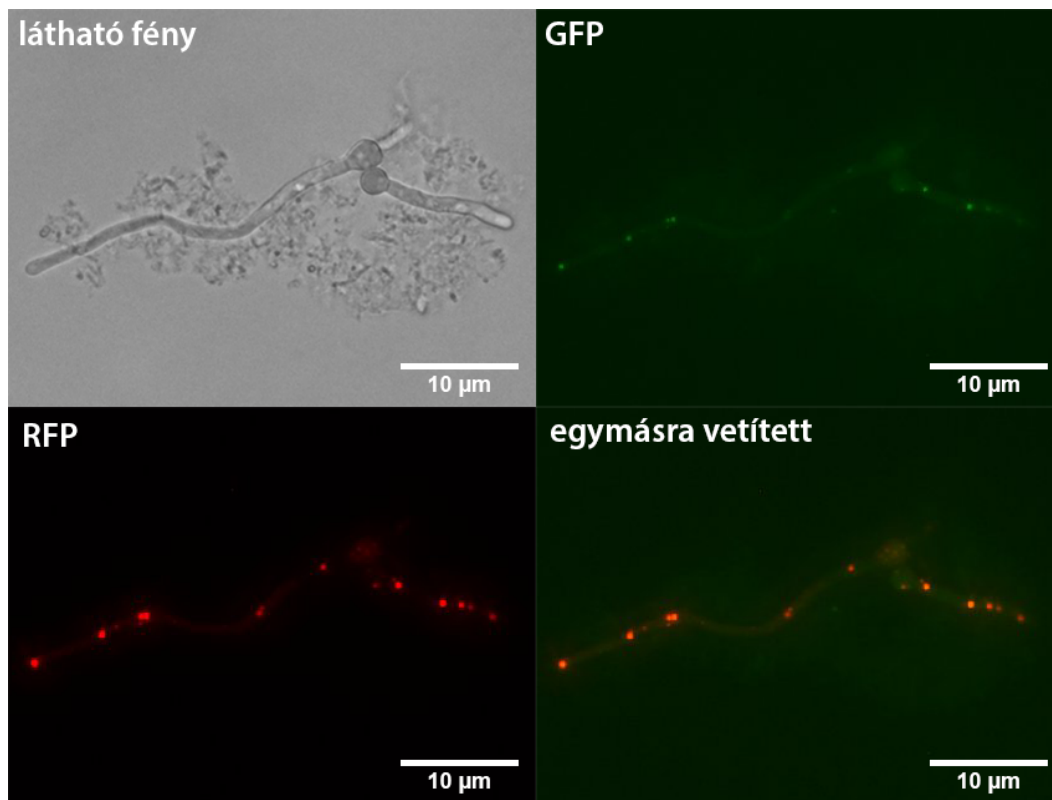
**25. ábra: A *hxnV-gfp* fúziós konstrukciót kifejező törzs mikroszkópos vizsgálata.**

A 6-NA-val, biotinnal és para-amino-benzoessavval kiegészített MM tápoldatban felnövesztett HZS.555 törzs Zeiss Axiolab A (Zeiss szűrő szett 15) mikroszkóppal végzett vizsgálata. Balra látható a fénymikroszkópos kép, jobbra pedig a HxnV-GFP zöld fluoreszcens jel.

#### 6.9.2. A *gfp-hxnX* fúziós konstrukciót kifejező törzs létrehozása

Mivel az *in silico* vizsgálatok alapján a HxnX fehérje peroxiszómás lokalizációs szignálja (PTS) a C-terminálison található, ezért a GFP fúziót a fehérje N-terminálisára terveztük. A transzformáló konstrukciót az 5.11.2. alfejezetben leírtak alapján készítettük el („*pantoB*<sup>+</sup> *gfp-hxnX* fúziós kazetta”). A transzformáláshoz keresztezéssel hoztunk létre egy PTS-RFP-t kifejező (peroxiszómás target jelet hordozó Red Fluoreszcens Protein) *pantoB100* (pantoténsav auxotróf) *hxnXΔ* törzset (HZS.534), amelyet a „*pantoB*<sup>+</sup> *gfp-hxnX* fúziós kazettával” transzformáltunk. Az 50 pantoténsav prototróf transzformánsból 14-et választottunk ki előzetes, GFP és RFP jelek megjelenését tesztelő fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz, melyek közül 10 transzformáns esetében láttunk zöld és piros fluoreszcens jelet is. A qPCR-rel végzett kópiaszám meghatározás kimutatta, hogy a transzformánsok egytől 10-ig terjedő kópiában hordozzák a fúziós kazettát. A GFP és RFP fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során minden esetben a GFP-HxnX peroxiszómás lokalizációját figyeltük meg. Mivel az egy kópiában integrálódott kazettát hordozó törzs zöld fluoreszcens jele gyenge volt, a kolokalizáció dokumentálására egy hétkópiás integrációt hordozó transzformáns törzset választottunk (HZS.579), amelyben a zöld fluoreszcens jel összevethető volt a peroxiszómákban lokalizálódó RFP jel intenzitásával. A HZS.579 törzzsel végzett mikroszkópos vizsgálatok alátámasztották a HxnX fehérje feltételezett peroxiszómás lokalizációját (26. ábra).





**26. ábra: A *gfp hxnX* fúziós konstrukciót kifejező törzs mikroszkópos vizsgálata.**

A 6-NA-val és piridoxinnal kiegészített MM tápoldatban felnevesztett HZS.579 törzs Zeiss Axiolab A (Zeiss szűrő szett 09) mikroszkóppal végzett vizsgálata. Balra fent a fénymikroszkópos kép, jobbra fent a GFP-HxnX zöld fluoreszcens jel, balra lent a PTS-RFP vörös fluoreszcens jel, jobbra lent pedig a kolokalizáció vizsgálata látható.

#### 6.10. További deléciós törzsek létrehozása analitikai vizsgálatokhoz

Annak érdekében, hogy további információkat gyűjtsünk a lebontás folyamatáról, az analitikai vizsgálatokat nem csak a szimpla, de a rendelkezésünkre álló halmozottan deléciós mutánsokon is elvégeztük. A növekedési tesztek eredményei alapján úgy gondoltuk, hogy a lebontás génjeire nézve deléciós mutánsok kombinálásával fontos információkhoz juthatunk a katabolizmus folyamatáról, ezért az analitikai vizsgálatokhoz további mutáns törzseket hoztunk létre genetikai keresztezéssel.

##### 6.10.1. A *hxnMΔ/hxnXΔ* dupla mutáns törzs létrehozása analitikai vizsgálati anyagok előállítása céljából

A *hxnMΔ/hxnXΔ* dupla deléciós mutáns keresztezéssel (5.7. alfejezet) történő létrehozásához a HZS.293 (*hxnMΔ*) és a HZS.297 (*hxnXΔ*) törzseket használtuk fel. Bár mind a két gén *riboB*<sup>+</sup> szelekciós marker gén segítségével lett deletálva, de eltérő kromoszómán találhatóak, ezért kevés számú utód átvizsgálásával is pozitív eredményt vártunk. Az utódok



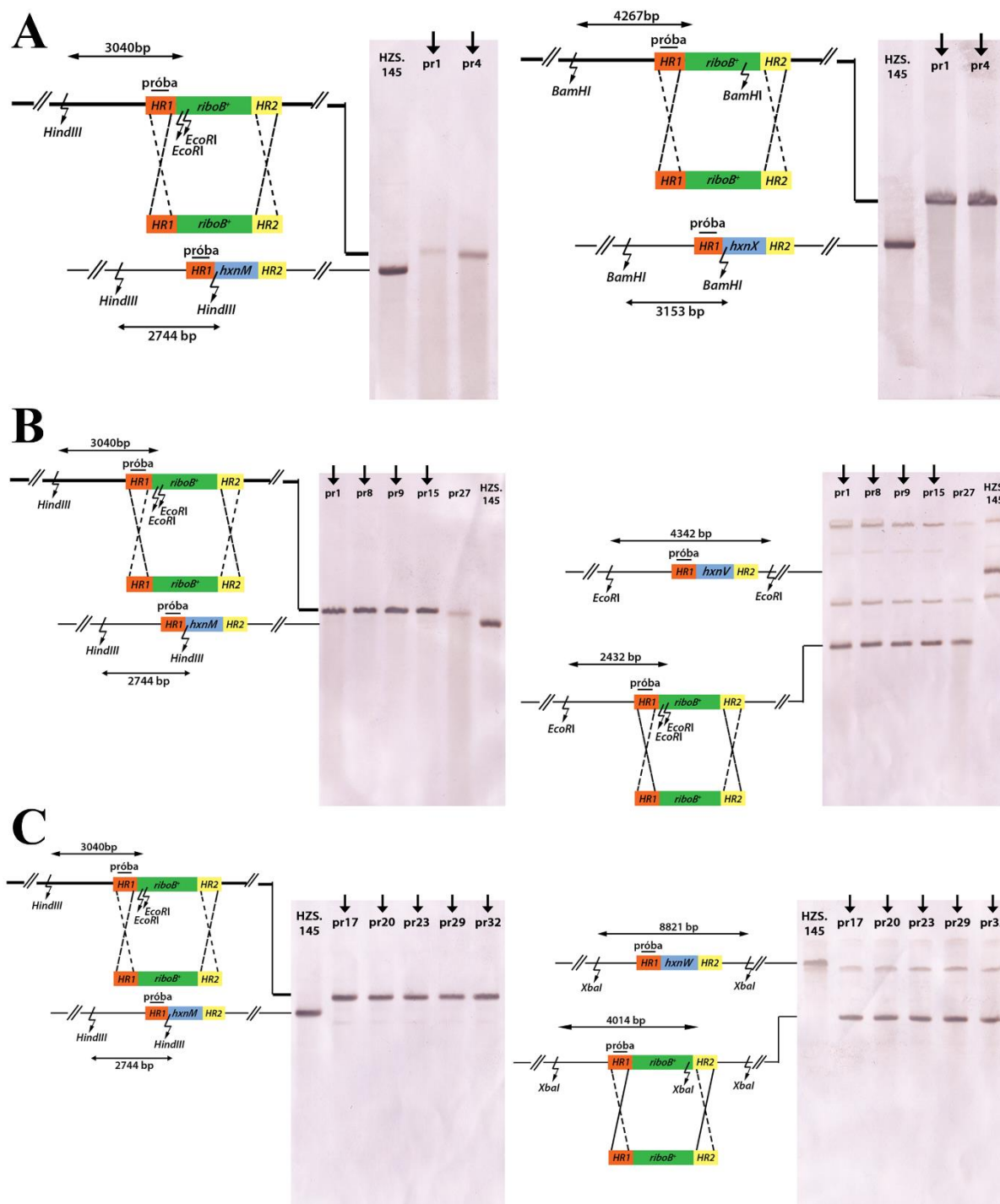
közül a „hxnM ReTi frw” és „hxnM ReTi rev”, valamint a „hxnX frw” és „hxnX NotI rev” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR előszelekcióval választottuk ki a megfelelő utódokat, majd Southern analízis segítségével ellenőriztük, hogy a kiválasztott törzsek valóban mind a két génre nézve deléciós mutánsok-e (27. ábra, A panel). A létrehozott dupla mutáns utódok közül egyet (pr1) választottunk ki a további vizsgálatokhoz, amelyet HZS.582-nek nevezünk el.

#### *6.10.2. A hxnMΔ/hxnVΔ dupla mutáns törzs létrehozása analitikai vizsgálati anyagok előállítása céljából*

A *hxnMΔ/hxnVΔ* dupla mutáns törzs keresztezéssel (5.7. alfejezet) történő létrehozásához a HZS.292 (*hxnMΔ*) és a HZS.294 (*hxnVΔ*) törzseket használtuk fel. Ebben az esetben is mind a két törzsben *riboB*<sup>+</sup> szelekciós marker génnel deletáltuk a target géneket, ezért az utódok közül szintén PCR előszelekcióval („hxnM ReTi frw” és „hxnM ReTi rev”, valamint „hxnV AS frw” és „hxnV AS rev” indítószekvenciákkal, 4. melléklet) választottuk ki a mindkét génre nézve mutáns törzseket. Ezt követően Southern analízis segítségével ellenőriztük, hogy a vizsgált törzsek hordozzák-e a deléciót mind a két gén esetében (27. ábra, B panel). A létrehozott dupla mutáns utódok közül egyet (pr1) választottunk ki a további vizsgálatokhoz, amelyet HZS.584-nek nevezünk el.

#### *6.10.3. A hxnMΔ/hxnWΔ dupla mutáns törzs létrehozása analitikai vizsgálati anyagok előállítása céljából*

A *hxnMΔ/hxnWΔ* dupla deléciós mutánst a HZS.292 (*hxnMΔ*) és a HZS.393 (*hxnWΔ*) törzsek keresztezésével (5.7. alfejezet) hoztuk létre. Ebben az esetben is azonos szelekciós marker génnel (*riboB*<sup>+</sup>) történtek a géndeléciók, ezért az utódok közül a „hxnM ReTi frw” és „hxnM ReTi rev”, valamint a „hxnW AS frw” és „hxnW AS rev” indítószekvenciákkal (4. melléklet) végzett PCR előszelekcióval választottuk ki a mind a két génre nézve mutáns törzseket. A kiválasztott törzsek esetében Southern analízissel igazoltuk, hogy valóban mind a két génre nézve deléciós mutánsok voltak (27. ábra, C panel). A létrehozott dupla mutáns utódok közül egyet választottunk ki (pr17) a további vizsgálatokhoz, amelyet HZS.588-nak nevezünk el.



**27. ábra: A *hxnM/hxnX* (A), *hxnM/hxnV* (B) és *hxnM/hxnW* (C) mutánsok ellenőrzésére használt Southern-hibridizációs stratégiák.**

A Double-Joint PCR eljárással létrehozott, *riboB<sup>+</sup>* szekvenciát tartalmazó szubsztitúciós kazetta sémája minden esetben az ábra bal oldalán látható. A narancssárga és sárga téglalapok a targetálást szolgáló, a genomi régióval homológ szakaszokat jelölik (HR1: a deletálás helyétől upstream irányba eső szekvencia, HR2: a deletálás helyétől downstream irányba eső szekvencia). A *hxnM<sup>+</sup>* és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét HindIII és EcoRI enzimekkel (A, B, C), a *hxnX<sup>+</sup>* és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét BamHI enzimmel (A), a *hxnV<sup>+</sup>* és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét EcoRI enzimmel (B), a *hxnW<sup>+</sup>* és a potenciális deléciós mutánsok DNS-ét pedig XbaI enzimmel (C) emésztettük (a villám alakú nyilak a HindIII, EcoRI, BamHI és XbaI hasítóhelyeket jelölik). Hibridizációs próbának PCR eljárással felszaporított szekvenciákat használtunk (*hxnM* upst nest frw és *hxnM* upst rev - [A, B, C], *hxnV* AS frw és *hxnV* down nest rev - [A], *hxnV* upst nest frw és *hxnV* upst rev - [B], illetve *hxnV* AS frw és *hxnW* upst rev - [C]; lásd 4. melléklet), melyeket az ábrán „probe” névvel jelöltünk. A jobb oldalon a Southern-hibridizációs membránokat ábrázoltuk a *hxnM<sup>+</sup>*, *hxnX<sup>+</sup>*, *hxnV<sup>+</sup>* és

*hxnW*<sup>+</sup> (HZS.145) és a vizsgált utód törzsek hibridizációs jeleivel. A *hxnX* és *hxnM* esetében az alsó séma az intakt lókuszt, a felső a kazetta beépülése esetén létrejövő *riboB*<sup>+</sup> szelekciós markerrel kicserélt lókuszt, a *hxnV* és *hxnW* esetében pedig a felső séma az intakt lókuszt, az alsó a kazetta beépülése esetén létrejövő *riboB*<sup>+</sup> szelekciós markerrel kicserélt lókuszt ábrázolja. A szaggatott vonalak a homológ rekombinációs eseményeket jelölik.

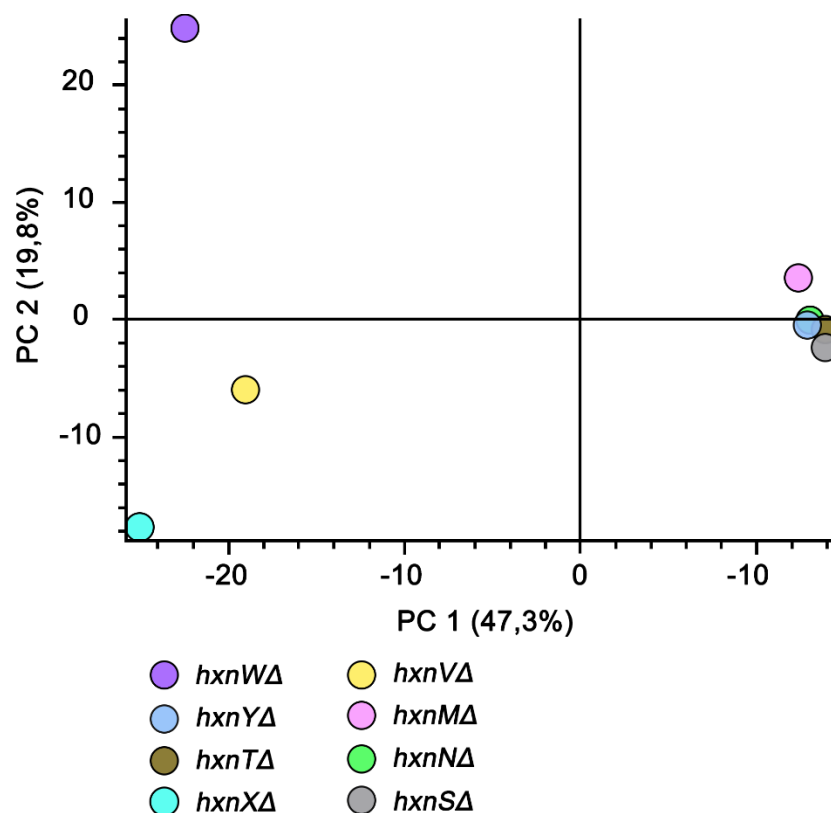
### 6.11. A deléciós mutánsok GC-MS és HPLC-MS analízissel történő vizsgálata

A GC-MS és HPLC-MS méréseket és az adatok elemzését az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék analitikai műhelyében Dr. Varga Mónika végezte el. A kísérleteinkbe a *hxnPΔ* és *hxnZΔ* törzsek kivételével minden *hxn* génre nézve deléciós törzset bevontunk. A *hxnPΔ* és *hxnZΔ* törzsekkel azért nem végeztünk méréseket, mert azok transzportereket kódolnak, így közvetlenül nem vesznek részt a NA molekula átalakításában, de a NA, vagy származékainak extracelluláris térből történő felvételével és/vagy intracelluláris transzportjával részei a NA katabolikus rendszernek.

GC-MS és HPLC-MS módszerrel (5.15. és 5.16. alfejezet) vizsgáltuk a *hxnR*<sup>c</sup> genetikai háttérű *hxnSΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*, *hxnXΔ*, *hxnVΔ*, *hxnWΔ*, *hxnMΔ* és *hxnNΔ* szimpla deléciós, valamint a rendelkezésünkre álló halmozottan deléciós törzseket (*hxnShxnTΔ*, *hxnSΔ/hxnYΔ*, *hxnTΔ/hxnYΔ*, *hxnShxnTΔ/hxnYΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ*, *hxnMΔ/hxnXΔ*, *hxnMΔ/hxnWΔ*). A NA és 6-NA szubsztrátok felhasználását tesztelő tenyészetekből készített vizsgálati minták metabolit profilját, valamint a negatív kontrollként alkalmazott *hxnRΔ* törzs metabolit profilját használtuk az analitikai vizsgálatok során. A tenyésztést nem végezhetjük kizárólag NA-on, vagy 6-NA-on, hiszen egyes deléciós törzsek nem képesek növekedni ezeken a nitrogénforrásokon, még konstitutív *hxnR*<sup>c</sup> genetikai háttérrel sem. Ezért a törzseket előbb 24 órás inkubációval neutrális acetamid nitrogénforráson neveltük fel, majd a micéliumokat szűrést követően áthelyeztük 10 mM NA, vagy 10 mM 6-NA szubsztrátot tartalmazó tápoldatba, és különböző ideig tovább inkubáltuk őket. Az adagolt NA, vagy 6-NA szubsztrát fogyasztását HPLC-UV mérésekkel monitoroztuk, és megállapítottuk, hogy a legoptimálisabb, ha 16 órán át inkubálunk NA-val, vagy 6-NA-val. Ezen inkubációs idő alatt a NA/6-NA szubsztrát fogyás 80%-os volt és nitrogén éhezés állt be azon mutánsok esetén, amelyek nem tudnak nőni ezeken a nitrogénforrásokon, de még nem mutatták a nekrozis jeleit. Ezért 16 órán túli tenyésztésekkel nem kísérleteztünk. Mivel a HxnS lassú kinetikával alakítja át a NA-at 6-NA-vá (Sealy-Lewis és mtsai., 1979), úgy gondoltuk, hogy hatékonyabb lesz, ha 6-NA szubsztráttal indítjuk az analitikai vizsgálatokat.

A deléciós törzsek 6-NA felhasználását tesztelő vizsgálata során nyert mintákban HPLC-MS segítségével az *m/z* 50-500 tömegtartományban detektált összes metabolitot alapul

véve, az adatokat normalizálva a *hxnRΔ* törzs metabolit profiljára, főkomponens analízis végeztünk, melynek eredménye a 28. ábrán látható.



**28. ábra: A *hxnR<sup>c</sup>* genetikai háttérű *hxnSΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*, *hxnXΔ*, *hxnVΔ*, *hxnWΔ*, *hxnMΔ* és *hxnNΔ* szimpla deléciós mutánsok főkomponens analízise.**

A *hxnR<sup>c</sup>* *hxnSΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*, *hxnXΔ*, *hxnVΔ*, *hxnWΔ*, *hxnMΔ* és *hxnNΔ* deléciós mutánsok 6-NA felhasználását tesztelő vizsgálata során nyert mintákban az *m/z* 50-500 tömegtartományban detektált összes metabolitot vettük alapul, melyket a *hxnRΔ* törzs metabolit profiljára normalizáltunk.

A főkomponens analízis eredménye alapján a *hxnWΔ* mutáns elkülönül az összes többi deléciós törzstől (28. ábra). Ez egybevág azzal az elképzelésünkkel, hogy a HxnW egy alternatív útvonalban játszik szerepet, hiszen hosszú tenyésztési idő alkalmazásával NA-on, 6-NA-on és 2,5-DP-en úgynevezett „leaky” fenotípust mutatott. Mivel hasonlóan „leaky” fenotípust a *hxnTΔ* és *hxnYΔ* mutánsoknál tapasztaltunk NA és 6-NA nitrogénforrásokon, ezért elképzelhető, hogy ez a három enzim a lebontás egy alternatív utvonalaán vesz részt. Jelenleg zajlik a *hxnWΔ*, *hxnTΔ* és *hxnYΔ* deléciók keresztezésével előállított *hxnWΔ/hxnTΔ* és *hxnWΔ/hxnYΔ* dupla mutánsok, valamint *hxnWΔ/hxnTΔ/hxnYΔ* tripla mutáns ellenőrzése Southern analízissel a további kísérletekbe történő bevonásuk előtt. A *hxnXΔ* és *hxnVΔ* mutánsok metabolit profilja hasonló volt (28. ábra), amely azt jelezheti, hogy közel állnak egymáshoz a katabolikus útvonalon. Ezt megerősítik a Hx diagnosztikai táptalajon kapott

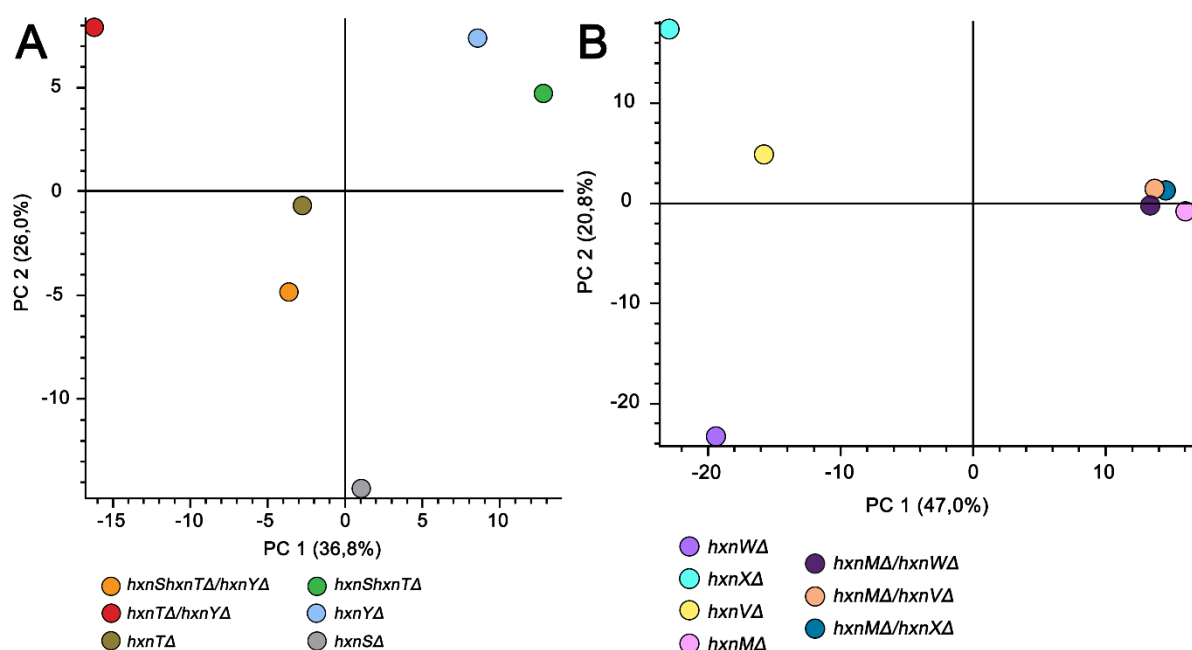
eredmények, amelyek azt mutatják, hogy a HxnX és HxnV a valódi inducer képződés előtti lépéseknél játszanak szerepet, míg a HxnM és HxnN a valódi inducer létrejötte után. Ezen kívül a kék (zöld) színanyag képzését a *hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* mutánsban a *hxnX* delécia megszüntette, ezzel megvilágítva az HxnX és HxnV működésének sorrendjét a lebontási útvonalban. Az inducer képződésére vonatkozó növekedési tesztek alapján a HxnW-t a valódi inducer képződés utáni lépésekre kellene helyezni a HxnY-nal és HxnT-vel együtt, de ahogy azt az előbbiek során kifejtettük, valószínűbb, hogy ez a három enzim a katabolikus út elején, egy alternatív útvonalon szerepelhet, amely megmagyarázza a Hx diagnosztikai táptalajokon megfigyelhető növekedésüket.

A *hxnSΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*, *hxnMΔ* és *hxnNΔ* törzsek metabolit profiljuk alapján együtt klasztereződtek, bár a *hxnMΔ* mutáns határozottan elkülönült a többi deléciós profiltól (28. ábra). A *hxnSΔ*, *hxnTΔ* és *hxnYΔ* mutánsok együtt klasztereződése a *hxnNΔ* törzsszel azzal magyarázható, hogy a kiindulási szubsztrát a 6-NA volt és a *hxnSΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*, és *hxnNΔ* törzsek mind képesek (bár eltérő hatékonysággal) hasznosítani a 6-NA-at (20. ábra). Így értelemszerűen a 4 deléciós törzs főkomponens profilja nagyon hasonlóan alakul. A *hxnMΔ* és *hxnNΔ* törzsek profilja eltér, mégis közel állnak egymáshoz (28. ábra), hiszen bár a *hxnMΔ* törzs nem képes a 6-NA-at hasznosítani, a HxnM és HxnN enzimek az egyedüliek, amelyek a valódi inducer létrejötte után játszanak szerepet az útvonalban, tehát az útvonal végén, egymás után működhetnek. Ezek az eredmények megerősítik a HxnM és HxnN *in silico* funkcióelemzése során prediktált szerepükkel, valamint összhangban vannak a növekedési tesztekkel is (6.3. alfejezet és 20. ábra).

A rendelkezésre álló halmozott deléciós mutánsokban detektált metabolitok a szimpla deléciós mutánsokéval egyező eljárással létrehozott főkomponens analízisének eredményét a 29. ábra mutatja.

A 29. ábra „A” paneljében a *hxnSΔ*, *hxnTΔ* és *hxnYΔ* szimpla és halmozottan deléciós mutánsokra vonatkozó eredményeket ábrázoltuk, mely alapján a három szimpla mutáns egyénileg elkülönül a metabolit profilja alapján. A *hxnShxnTΔ* dupla mutáns a *hxnYΔ* szimpla mutánssal mutat klasztereződést, a *hxnShxnTΔ/hxnYΔ* tripla mutáns a *hxnTΔ* szimpla mutánssal klasztereződik, míg a *hxnTΔ/hxnYΔ* mutáns nem mutat klasztereződést egyik mutánssal sem. Mindezekből, valamint a növekedési tesztekéből (20. ábra) arra következtethetünk, hogy a HxnS után a valószínűleg kettéváló útvonal egyik ágán előbb a HxnY, majd a HxnT következik, a másik ágon pedig egy alternatív út található a HxnW működésével.

A 29. ábra „B” paneljében a *hxnXΔ*, *hxnWΔ*, *hxnVΔ* és *hxnMΔ* szimpla és a *hxnMΔ* előbbi deléciókkal létrehozott dupla deléciós törzsekben (*hxnMΔ/hxnXΔ*, *hxnMΔ/hxnWΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ*) detektált metabolitok főkomponens analízisének eredménye látható. Minden *hxnMΔ* törzzsel képzett dupla mutáns a szimpla *hxnMΔ* mutánszal klasztereződik, amely megerősíti az alternatív útvonal meglétét, hiszen a dupla mutáns törzsekben csak abban az esetben juthat el a lebontás a *hxnM* génik, ha a *hxnX*, a *hxnV*, vagy a *hxnW* gének hiánya önmagában nem gátolja meg a lebontás eljutását a közös szakaszig, ahol azonban a *hxnM* gén hiánya miatt megáll a lebontás.

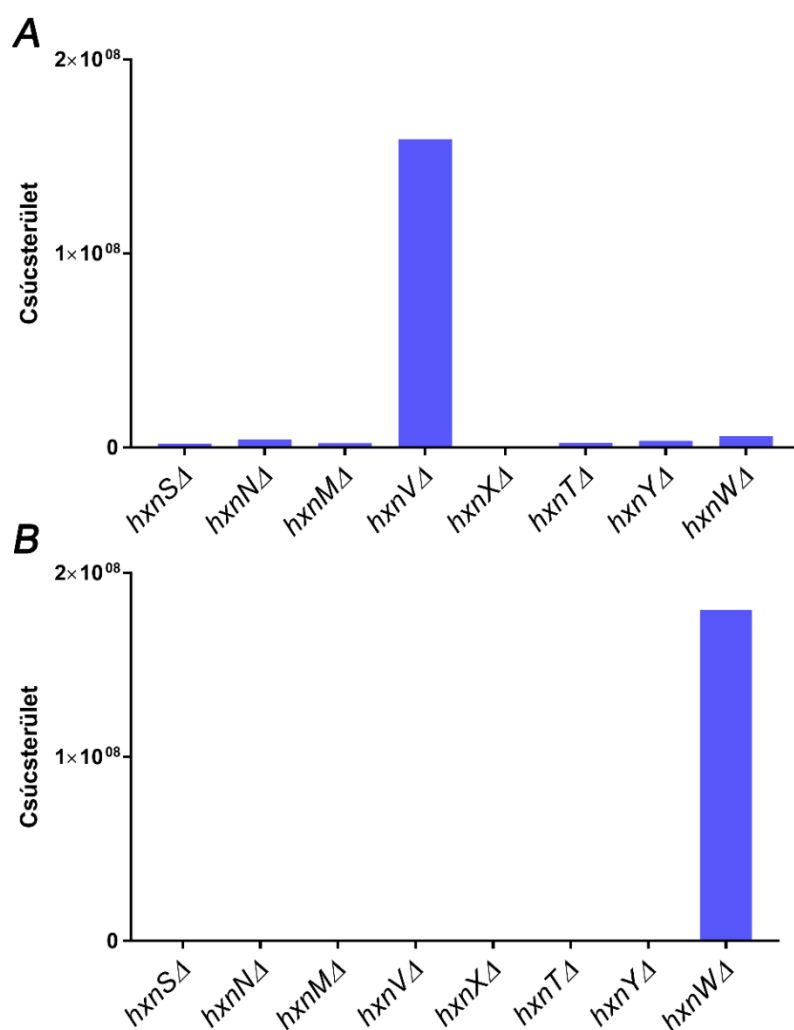


**29. ábra: A szimpla és a halmozottan deléciós mutánsok főkomponens analízise.**

**A panel:** a *hxnSΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*, *hxnTΔ/hxnYΔ*, *hxnShxnTΔ* és *hxnShxnTΔ/hxnYΔ* deléciós mutánsok 6-NA felhasználását tesztelő vizsgálata során nyert mintákban a HPLC-MS analízis során az *m/z* 50-500 tömegtartományban detektált összes metabolitot vettük alapul, melyket a *hxnRΔ* törzs metabolit profiljára normalizáltunk. **B panel:** a *hxnMΔ*, *hxnVΔ*, *hxnXΔ*, *hxnWΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ*, *hxnMΔ/hxnXΔ* és *hxnMΔ/hxnWΔ* deléciós mutánsok 6-NA felhasználását tesztelő vizsgálata során nyert mintákban az *m/z* 50-500 tömegtartományban detektált összes metabolitot vettük alapul, melyket a *hxnRΔ* törzs metabolit profiljára normalizáltunk.

A metabolitok egyes komponenseinek vizsgálata során két kivétellel az egyes metabolitok egynél több *hxn* mutáns metabolit profiljában is előfordultak. Ez a jelenség a metabolitok reverz irányú átalakulásával, valamint az enzimek eltérő kinetikával történő működésével és a köztes metabolitok stabilitásával állhat összhangban. A két kivételt képező metabolit közül az egyik a 111g/mol molekulásúlyú 2,5-DP volt, amely csak a *hxnVΔ*

mutánsban halmozódott fel (30. ábra „A” panel). Ez alapján valószínűsíthetően a HxnV szubsztrátja a 2,5-DP. A másik metabolit egy 131 g/mol molekulásúlyú vegyület volt, amelynek összetétele  $C_5H_9O_3N$  és kizárólag a *hxnW*Δ mutánsban halmozódott fel (30. ábra „B” panel). Figyelembe véve a vegyület összetételét és MS<sup>2</sup> spektrumát (5. melléklet), feltételezzük, hogy a molekula az 1,2,3,6-tetrahidro-piridin-2,3,6-triol. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a HxnW szubsztrátja valószínűleg az 1,2,3,6-tetrahidro-piridin-2,3,6-triol, ami a *B. niacini*-ben található 2,3,6-trihidroxipiridin köztesterméknek (Ensign & Rittenberg, 1964) egy kevésbé telített származéka. Kerestük a metabolitok között azokat a vegyületeket, amelyek a prokariótáknál a piridingyűrű felnyílását követően alakulnak ki, különös tekintettel az N-formil maleinsavamid és a maleinsavamid köztes metabolitokra, azonban egyik mérés során sem tudtuk ezeket a vegyületeket kimutatni a mintáinkból. Ennek magyarázata az lehet, hogy ezek a vegyületek instabilak, vagy az, hogy nem képzik részét az *A. nidulans* NA katabolizmusának.



**30. ábra: A 2,5-DP és a 131g/mol molekulásúlyú vegyület felhalmozódásának HPLC-MS mérési adatai.** Az „A” panel mutatja a 2,5-DP felhalmozódását a *hxnV*Δ mutáns törzsben acetamid nitrogénforrást tartalmazó tápoldatban történő előtenyésztést (37 °C, 24 óra) követő 10 mM 6-NA szubsztráton történő inkubálás (37 °C, 16

óra) után. A „**B**” **panelen** a 131g/mol molekulasúlyú vegyület (feltételezett 1,2,3,6-tetrahidro-piridin-2,3,6-triol) felhalmozódása látható a *hxnWΔ* törzsben az „A” panelben részletezett tenyésztési körülmények mellett.

Figyelembe véve, hogy a bakteriális NA katabolikus útvonalak csak egyetlen vonalon történnek, az *A. nidulans* esetén azonban egyes átalakulások alternatív úton is történhetnek, valamint hogy azonosítottunk olyan metabolitot, amelyet a prokarióta útvonalaknál eddig nem figyeltek meg, igazolja azt a kezdeti elképzelésünket, hogy az eukarióta lebontási útvonal eltér a prokariótáknál megismert útvonalaktól.

Jelenleg minden hiányzó halmozottan deléciós mutáns előállítása folyamatban van, amely a *hxn* deléciókat az összes kombinációban lefedi. Elképzelésünk szerint ezek metabolom vizsgálata egyrészt megerősítheti a már előre jelzett útvonal lépéseket, másrészt pedig számos, eddig ismeretlen lépésre deríthet fényt.



## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Annak ellenére, hogy a természetben számos mikroorganizmus képes a nikotinsavat (NA) nitrogénforrásként hasznosítani, a lebontás folyamatát eddig mégis mindössze prokarióták esetében tanulmányozták. Eukariótákban teljesen ismeretlen a katabolizmus folyamata annak ellenére, hogy az *Aspergillus nidulans*-ról már az 1970-es évek óta tudják, hogy képes a NA hasznosítására és jellemezték a lebontási út első lépését végző enzimet, a PHII-t (későbbiekben HxnS), valamint NA-at nem hasznosító mutánsokat izoláltak. A PHII megismerése érdekes módon a purin hasznosítási útvonal vizsgálatához kapcsolódik. A purin hasznosítási útvonalban szereplő *hxA* gén termékéről, a purin hidroxiláz I (PHI) enzimről régóta ismert, hogy képes a hipoxantin (Hx) xantinná, majd a xantint húgysavvá alakítani. A *hxA* génre nézve mutáns törzsek elemzése során fedezték fel a PHII enzimet, amely szintén képes a Hx-t xantinná alakítani, azonban a xantin→húgysav átalakításra képtelen. A vizsgálatok során kiderítették, hogy a PHII enzim a Hx mellett a NA-at is képes szubsztrátként hasznosítani és 6-hidroxi-nikotinsavvá (6-NA) alakítani. A 2000-es években kutatócsoportunk megkezdte az első eukarióta NA lebontási útvonal felderítését *A. nidulans* modellszervezetben. Kísérleteink során azonosítottuk a PHII enzimet kódoló *hxnS* gént (AN9178), valamint a lebontási útvonal transzkripció faktorának génjét, a *hxnR*-t (AN11197). Az ezekkel szomszédos gének vizsgálata során további négy olyan gént (*hxnT*, *hxnY*, *hxnP* és *hxnZ*) találtunk, amelyek a *hxnS*-hez hasonlóan a *hxnR* gén szabályozása alatt állnak és kifejeződésük a NA-tól és annak downstream származékaitól függ. A felfedezett hat génből álló klasztert NDC1-nek neveztük el. Munkánk során az NDC1 klaszterbe tartozó génekre nézve deléciós mutánsokat hoztunk létre, melyek különböző nitrogénforrásokon végzett növekedési tesztjei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy további, még ismeretlen gének is részt vesznek a NA lebontásának folyamatában.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, melyek ezek az eddig ismeretlen gének, egy, az 1970-es évekből származó *hxn6* elnevezésű mutáns vizsgálatába kezdtünk, amely nem képes nitrogénforrásként hasznosítani sem a NA-at, sem pedig a 6-NA-at. Mivel az 1970-es években a *hxn6* lókuszt az NDC1 klaszterben található *hxnS* és *hxnR* lókusztól kb. 40 kb távolságra térképezték, tudtuk, hogy a *hxn6* lókuszt azonosítása jelentősen elősegíti a NA katabolikus út genetikai hátterének feltárását. A *hxn6* mutáns törzsbe *A. nidulans* génbank transzformálást hajtottunk végre és direkt szelekció alkalmazásával izoláltunk egy NA-at hasznosítani képes transzformáns törzset. A *hxn6*-ot komplementáló génbank plazmid menekítését követően szekvenálás segítségével **az AN11187 génben azonosítottuk a *hxn6* törzs fenotípusát okozó**

**mutációt.** Az AN11187 (későbbiekben *hxnV*) az NDC1 klasztertől mintegy 40 kb távolságra helyezkedik el. A *hxn6* egy G1171A nukleotid cserét hordoz, amely a kódolt fehérjében W296STOP AS cserét okozva láncterminációt eredményez. Ezt követően megvizsgáltuk a *hxnV*, valamint az ezzel szomszédos AN9159, AN11172, AN9161, AN9162 és AN9163 gének kifejeződését qRT-PCR segítségével *hxnR*<sup>+</sup> és *hxnRA* törzsekben nem indukált és indukált (1 mM 6-NA-val történő indukció) körülmények között. A *hxnV*, az AN11172 és az AN9161 gének koregulációt mutattak az NDC1 génekkel (kifejeződésük HxnR és NA származék függést mutatott), mely alapján igazoltuk, hogy ezek a gének a NA katabolikus útvonalban szerepelnek. Az AN11172 és AN9161 géneket *hxnW*-nek és *hxnX*-nek neveztük el. **A NA lebontási útvonal génjeiként azonosított *hxnV*, *hxnW* és *hxnX* gének az NDC1-től 40 kb távolságra a VI-os kromoszómán egy újabb klasztert alkotnak, amelyet NDC2-nek neveztünk el.**

Korábbi *in silico* vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy számos gombarendben megtalálhatóak az NDC1 gének ortológjai. A NA katabolikus génklaszterek evolválódásának megismeréséhez egy kiterjedt *in silico* analízist végeztünk el közel 200 *Pezizomycotina* genomon szinténiát figyelembe vevő ortológkeresési eljárással a JGI Fungal Genome Portal adatbázisát használva. Érdekes módon a legtöbb gombafajban az NDC1 és NDC2 génjei egyetlen klaszterbe szerveződnek. A génsorrend vizsgálatakor megfigyeltük, hogy bizonyos gének génpárokba rendeződve erős konzerváltságot mutatnak. A génpárokat alkotó gének közül kettő, az I. kromoszómán egymás mellett elhelyezkedő AN6518 és AN10833 gének számunkra ismeretlenek voltak.

A két újonnan felfedezett gén (AN6518 és AN10833, a későbbiekben *hxnM* és *hxnN*) esetében is transzkriptum analízissel vizsgáltuk a génkifejeződés HxnR és NA származékok általi regulációját. **Ez alapján a *hxnM* és *hxnN* gének is a NA katabolikus úthoz kapcsolhatóak. A két gén által alkotott klasztert NDC3-nak neveztük el.**

**Az NDC2-be és NDC3-ba tartozó gének cDNS szekvenciáinak kísérletes úton történő azonosítása során fényt derítettünk arra, hogy az AspGD adatbázisban szereplő intronok a *hxnV* gén esetén nem helytállóak.**

**Az újonnan felfedezett két klaszterbe tartozó gének funkciójának megismeréséhez *in silico* elemzést végeztünk el, melynek eredményei alapján a következőket kaptuk:**

- A HxnV valószínűleg egy FAD-függő fenol-monooxygenáz, amelynek szubsztrátja feltehetően a 2,5-dihidroxipiridin (2,5-DP).
- A HxnX egy N-terminális FAD-kötő doménnel rendelkező fehérje, mely monooxygenázokkal mutat homológiát, szubsztrátja pedig valószínűleg a 6-NA és a 2,5-DP köztesterméket hozza létre.

- A HxnW fehérje vizsgálataink alapján rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz (SDR) szupercsalád tagjaival, oxidoreduktázokkal és NAD(P)-kötő fehérjékkel mutat homológiát. Feltételezhetően vagy ketoreduktázként működik, vagy dekarboxilációt végez a NA lebontás valamely aromás köztestermékén.
- A HxnM valószínűleg egy amido-hidroláz, amely a NA lebontás egy telített piridinggyűrűvel rendelkező köztestermékét hasítja fel egy szén és egy nitrogén molekula között.
- A HxnN pedig egy amidáz, amely valószínűleg lehasítja egy felnyílt gyűrűs szerkezetű köztestermék amid csoportját, mely ezt követően nitrogénforrásként hasznosulhat.

Korábbi eredményeink alapján feltételezzük, hogy a *hxnS*, *hxnT* és *hxnY* gének a lebontási útvonal kezdeti lépéseiben játszanak szerepet. Ennek bizonyítására *hxnShxnTΔ*, *hxnSΔ/hxnYΔ*, *hxnTΔ/hxnYΔ* és *hxnShxnTΔ/hxnYΔ* mutáns törzseket hoztunk létre. Ezek különböző nitrogénforrásokon végzett növekedési vizsgálataik során azt tapasztaltuk, hogy a *hxnShxnTΔ* és *hxnShxnTΔ/hxnYΔ* törzsek nitrogénforrásként 6-NA-at tartalmazó táptalajon a vad típushoz képest sokkal erősebb növekedést mutattak. Erre a meglepő fenotípusra magyarázat lehet, hogy a *hxnShxnTΔ* dupla mutáns előállítását egy közös szubsztitúciós kazetta transzformálásával végeztük, így ez a törzs nem tartalmazza a *hxnS* és *hxnT* gének közös promóter régióját. Az elmélet bizonyítására létrehoztunk egy olyan mutáns törzset, amelyben a promóter régiót nem érintette a deléció, azonban 6-NA nitrogénforráson ez a törzs is ugyanolyan erős növekedést mutatott, mint a promótert nem tartalmazó mutáns. A fenotípus magyarázatának megismeréséhez további vizsgálatok szükségesek.

**A lebontás folyamatának megértéséhez az NDC2 (*hxnV*, *hxnW* és *hxnX*) és NDC3 (*hxnM* és *hxnN*) klaszterbe tartozó génekre nézve deléciós mutánsokat hoztunk létre, és növekedési képességüket vizsgáltuk különböző nitrogénforrásokon. Az Allp-lal és 100 μM NA-val, vagy 6-NA-val kiegészített Hx diagnosztikus táptalajon végzett növekedési tesztek alapján, ahol a Hx hasznosítását egyedül a HxnS enzim végzi, megállapítottuk, hogy a HxnM és a HxnN a katabolikus útvonal valódi inducerének (mely nem a NA, vagy a 6-NA) termelődését követő lépésekért felelősek, míg a HxnV, HxnW és HxnX a valódi inducertől „upstream” vesznek részt a NA lebontásában. Amikor a NA-at és 6-NA-at nitrogénforrásként alkalmaztuk a *hxnVΔ*, a *hxnXΔ* és a *hxnMΔ* mutánsok közül egyik sem volt képes nőni, a *hxnWΔ* mutáns pedig „leaky” növekedést mutatott. A *hxnVΔ* és a *hxnXΔ* törzsekben halmozódó köztes termékek vagy toxikus hatásúak, vagy gátolják a konstitutív transzkripciós faktort. Mindezeket figyelembe véve valószínűsíthetjük, hogy a HxnV és**

**HxnX az útvonal azonos ágán működhetnek és részt vesznek a valódi inducer képzésében, a HxnW az alternatív útvonalon működhet, a HxnM pedig a lebontási út downstream, elágazás nélküli ágán játszik szerepet a NA lebontásának folyamatában.** A *hxnNΔ* törzs esetében tapasztalt redukált növekedés a NA és 6-NA nitrogénforráson, arra utalt, hogy nem a HxnN az egyedüli amidáz a katabolikus út végén, amely az amid csoport lehasításáért felel.

Annak érdekében, hogy a lebontási út génjeinek funkcióját az egyes mutánsokban az enzimműködés hiányában felhalmozódó metabolitokon keresztül vizsgálhassuk, biztosítanunk kellett az útvonalgének expresszióját a valódi inducer termelődésétől függetlenül. Ezt egy konstitutív *hxnR* (*hxnR<sup>c</sup>*) allél kifejeztetésével tudtuk biztosítani, ezért minden *hxn* deléciós mutánst *hxnR<sup>c</sup>7* háttérbe kerestettünk és vizsgáltuk a nitrogénforrás hasznosítási képességüket, valamint metabolit profiljukat. A HxnR folyamatos kifejeződése és a HxnS enzim aktivitása miatt azt vártuk, hogy minden mutáns nőni fog, ha az Allp-lal kiegészített Hx táptalajhoz NA-at vagy annak downstream származékait adagoljuk indukáló szer mennyiségben. Érdekes módon az 1 mM NA-val, vagy 6-NA-val kiegészített diagnosztikus Hx táptalajon a *hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* törzs nem volt képes nőni, a *hxnWΔ hxnR<sup>c</sup>7* pedig redukált növekedést mutatott, ugyanakkor 100 μM mennyiségben adagolva a NA-at, vagy 6-NA-at ezek a mutánsok a vad típusú törzsszel megegyező mértékű növekedést mutattak. A jelenség oka a köztes metabolit konstitutív háttér miatti túlzott felhalmozódása lehet, mely feltehetőleg toxikus a törzs számára, vagy inaktíválja a transzkripciós faktort. A *hxnXΔ* és *hxnMΔ* mutánsoknál is megfigyeltünk az előzőekhez hasonló, de kisebb mértékű toxicitást.

A *hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* törzset urea nitrogénforrás mellett adagolt 10 mM NA-on, vagy 10 mM 6-NA-on tenyésztve kék színű pigmentképződést figyeltünk meg a telep körül a táptalajban. Ehhez hasonló jelenséget baktériumok esetében (*Bacillus* és *Pseudomonas* fajokban) már leírtak és úgy gondolják, hogy a bakteriális kék pigment nem-enzimatis úton képződő azakinon, amely telítetlen tri-hidroxilált piridin származékból képződik. Jelenleg zajlanak a *P. putida* és az *A. nidulans* esetében termelődő kék pigmentek összehasonlítására és azonosítására irányuló GC-MS vizsgálatok.

A NA katabolikus útvonal feltárásának keretén belül kíváncsiak voltunk arra is, hogy az egyes katabolikus lépések milyen intracelluláris kompartmentben zajlanak. Az útvonal enzimek lokalizációjának vizsgálata céljából *in silico* lokalizációs szignál keresést követően létrehoztuk és vizsgáltuk a GFP fúziós HxnV és HxnX fehérjék intracelluláris kompartmentalizációját. **A HxnV feltételezhetően a citoplazmában, vagy valamely membránnal körülhatárolt kompartmentben, a HxnX pedig a peroxisómákban lokalizálódik.**

GC-MS és HPLC-MS vizsgálatokat indítottunk el a NA katabolikus út metabolitjainak azonosítása céljából. A vizsgálatok során a konstitutív *hxnR<sup>c</sup>* háttérbe juttatott szimpla deléciós törzseket (*hxnSΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*, *hxnV*, *hxnX*, *hxnW* és *hxnM*), valamint a keresztezésükkel létrehozott halmozottan deléciós mutánsokat (*hxnShxnTΔ*, *hxnSΔ/hxnYΔ*, *hxnTΔ/hxnYΔ*, *hxnShxnTΔ/hxnYΔ*, *hxnMΔ/hxnXΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ* és *hxnMΔ/hxnWΔ*) használtuk.

Az eddigi GC-MS és HPLC-MS eredményeink összhangban állnak a növekedési tesztek eredményeivel. A *hxnVΔ*, *hxnXΔ*, *hxnWΔ* és *hxnMΔ* szimpla és *hxnMΔ/hxnXΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ* és *hxnMΔ/hxnWΔ* dupla mutáns törzsek vizsgálata megerősítette az alternatív útvonal létezését. Metabolit profilja alapján mind a három dupla mutáns a szimpla *hxnMΔ* törzsszel klasztereződött, ami arra utal, hogy a *hxnV*, *hxnX*, vagy *hxnW* gén hiánya önmagában nem gátolja a lebontási útvonalat, a *hxnM* gén viszont már az útvonal közös szakaszán játszik szerepet, így a lebontás a dupla mutánsok esetében is itt akad el.

A *hxnSΔ*, *hxnTΔ* és *hxnYΔ* szimpla és a halmozottan deléciós törzsek analitikai vizsgálatainak eredményei szintén támogatták az alternatív út létezését a NA katabolikus folyamatban. Eredményeink alapján az alternatív útvonalak egyik ágán a HxnS után előbb a HxnY, majd a HxnT következik, a másik ágon pedig a HxnW működik. A deléciós törzsekben vizsgáltuk, hogy milyen köztes metabolitok halmozódnak fel a NA-on, vagy 6-NA-on történő inkubálás során. Azt figyeltük meg, hogy a nagy mennyiségben felhalmozódó metabolitok egynél több törzsben voltak megfigyelhetők, kivéve a 2,5-DP és egy 131 g/mol molekulásúlyú vegyület esetén. A 2,5-DP felhalmozódást kizárólag a *hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>7* törzsben tapasztaltunk, mely alapján valószínűsíthetjük, hogy a **HxnV enzim szubsztrátja a 2,5-DP**. A 131 g/mol molekulásúlyú vegyület kizárólag a *hxnWΔ hxnR<sup>c</sup>7* törzs esetében halmozódott fel. A vegyület szerkezeti azonosítására irányuló elemzések alapján ez a metabolit valószínűsíthetően az **1,2,3,6-tetrahidro-piridin-2,3,6-triol**, mely a **HxnW szubsztrátja lehet**.

Eredményeink jelentősen hozzájárultak a NA katabolikus út feltárásához, de az útvonal teljes felderítése további kísérleteket igényel. Elképzelésünk szerint a *hxnS*, *hxnT*, *hxnY*, *hxnV*, *hxnW*, *hxnX*, *hxnM* és *hxnN* deléciókra nézve halmozottan deléciós mutánsok létrehozása minden kombinációban megoldást fog nyújtani az eddig még nem tisztázott katabolikus lépéseket felderítésére.

## 8. SUMMARY

Although many microorganisms are able to utilize nicotinic acid (NA) as a sole nitrogen source, the degradation process was studied only in prokaryotes so far. The catabolic process is completely unknown in eukaryotes although it is known that some organisms, such as *Aspergillus nidulans* are able to utilize NA as the sole nitrogen source. Very few data were available about the NA catabolism at the beginning of our research. The enzyme acting in the first step of the NA utilization (purine hydroxylase II/PHII - later HxnS) was characterized and NA non-utilizer mutants were isolated. Interestingly, the identification of PHII was connected to the study of the purine utilization pathway. One of the key enzyme of purine breakdown is the purine hydroxylase I (PHI, encoded by *hxA*) that can convert hypoxanthine (Hx) to xanthine and xanthine to uric acid. During the study of PHI functions the PHII enzyme was discovered. In PHI loss-of-function mutants Hx was successfully utilized in case the medium was supplemented with low amount (100  $\mu$ M-1 mM) of NA or 6-hydroxynicotinic acid (6-NA). It was due to the production of PHII, which is able to convert Hx to xanthine, but is not able to convert xanthine to uric acid. The xanthine→uric acid transformation was found to be carried out by an alternative enzyme, an  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent xanthine dehydrogenase (XanA). The following studies revealed that besides Hx, PHII can also use NA as a substrate and can convert it to 6-NA. Several NA non-utilizer mutants were isolated in the 1970's and classified into linkage groups. Mutants of the *hxnS* group could not utilize NA, but could utilize 6-NA as a sole nitrogen source. Another group named *hxnR* were composed of mutants, that could utilize neither NA, nor 6-NA and could not grow on Hx media supplemented with the PHI inhibitor Allopurinol (Allp) and inducer amount of NA. They were thought to be regulatory mutants. Mutants of a third group named *aplA* could utilize NA and 6-NA more efficiently than the wild type strain and were able to grow on Hx media supplemented with Allp. Since NA induction was unnecessary in these strains to perform PHII activity, *aplA* mutants were thought to be regulatory mutants. Other linkage groups were also defined in the proximity of the *hxnS*, *hxnR* and *aplA* linkage groups but those results were never published and the strains with one exception (*hxn6*) were lost with time.

In the 2000's our group started to reveal the first NA degradation pathway in the model organism *A. nidulans* by identifying the PHII encoding *hxnS* gene as AN9178 and the transcription factor coding gene *hxnR* as AN11197. We also revealed that *aplA* is the same locus as *hxnR*, and *aplA* mutations refer to gain-of-function mutations, which lead to constitutive HxnR. We studied the regulation of *hxnS* and *hxnR* together with their flanking

genes (*hxnT*, *hxnY*, *hxnP* and *hxnZ*) and revealed a co-regulated cluster of six genes that are inducible by NA or 6-NA and their expression is depended on the transcription factor HxnR and transcription co-regulator AreA. We named this cluster NDC1. Through the obtaining of gene deletions for all *hxn* genes, we studied their role in NA utilization. We concluded that *hxnT* and *hxnY* code for enzymes operating on an alternative route in the pathway, *hxnP* and *hxnZ* code for transporters and *hxnS* codes for PHII, which is involved not only in NA→6-NA conversion but in the further conversion of the 6-NA. We found out, that 2,5-dihydroxypyridine (2,5-DP) is an intermediate compound of the pathway and may serve as inducer. We showed that other genes outside of the cluster NDC1 are involved in the NA utilization.

In order to find out what these unknown genes are, we started to examine the only extant mutant from the 1970's, *hxn6*, which is not able to utilize NA or 6-NA as a nitrogen source and was mapped outside of the NDC1 cluster, approximately 40 kb distance from the *hxnS* and *hxnR*. We knew that the identification of the *hxn6* locus would be very helpful for unravelling the genetic background of the NA catabolic pathway. By the transformation of the *hxn6* mutant with the plasmid gene bank of *A. nidulans* and selection for NA utilizing transformants followed by plasmid rescue and sequence analysis, **we identified one supressor gene of *hxn6*, AN11187. The AN11187 (later *hxnV*) is located approximately 40 kb from NDC1.** The *hxn6* allele contains a G1171A nucleotide change that causes a W296STOP (amber) amino acid change in the protein resulting in chain termination. Subsequently we analysed the expression of the flanking genes of *hxnV* (AN9159, AN11172, AN9161, AN9162 and AN9163) by qRT-PCR in *hxnR*<sup>+</sup> and *hxnRΔ* strains under non-inductive and inductive (induced with 1 mM 6-NA) conditions. *hxnV*, AN11172 and AN9161 showed co-regulation with the NDC1 genes (their expression depends on HxnR and NA derivatives) so these genes could be connected to the NA catabolic process. **We named AN11172 *hxnW* and AN9161 *hxnX* and the gene cluster formed by them together with *hxnV* was named NDC2.**

In order to understand the evolution of the NA catabolic gene clusters we carried out an extensive *in silico* analysis of the HxnS, HxnR, HxnT, HxnY, HxnZ, HxnP, HxnX, HxnW and HxnV orthologs identified in nearly 200 *Pezizomycotina* genomes on JGI Fungal Genome Portal database using gene onthology BLAST search with synteny analysis. Remarkably, we found that the NDC1 and NDC2 genes are organized into a single cluster in most fungal species. We noticed the conservation of certain gene pairs through the *Pezizomycotina*. *hxnS* was frequently coupled with *hxnT*, *hxnP* with *hxnY*, *hxnW* with AN6518 and *hxnV* with AN10833. Two of these genes, AN6518 and AN10833, were unknown for us. These genes are located next to each other on Chromosome I in the *A. nidulans* genome, which together with their

conserved association with *hxn* genes through the *Pezizomycotina* raised the possibility of their role in NA utilization.

Transcript analysis of these two genes showed that they are co-regulated with the *hxn* genes, therefore **AN6518 and AN10833 (under names *hxnM* and *hxnN*) can be regarded as new members of the NA utilization route, which form a third cluster, named NDC3.**

**We constructed the protein models of the NDC2 and NDC3 genes through sequencing their cDNAs and found out that protein model of *hxnV* in AspGD database is wrong.**

**With the protein sequence of NDC2 and NDC3 genes we carried out *in silico* analysis,** and hypothesized their possible function in the NA utilization. According to the *in silico* analysis:

- HxnV is probably a FAD-binding phenol monooxygenase and its substrate is supposedly 2,5-DP.
- HxnX has an N-terminal FAD-binding domain and it shows homology with monooxygenases. It may catalyze the hydroxylation of 6-NA to 2,5-DP.
- HxnW shows homology with members of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily, oxidoreductases and NAD(P)-binding proteins. It is believed that it either acts as a ketoreductase or it performs decarboxylation on an aromatic intermediate compound of the degradation pathway.
- HxnM is probably an amido-hydrolase which cleaves between a carbon and a nitrogen molecule in an intermediate of NA degradation pathway having a saturated pyridine ring.
- HxnN is an amidase, which supposedly cleaves the amid group from a compound with opened pyridine ring, that can be utilized as a nitrogen source thereafter.

Based on our previous results we hypothesized that *hxnS*, *hxnT* and *hxnY* genes play role in the initial steps of the degradation pathway. In order to support this idea, we created *hxnShxnTΔ*, *hxnSΔ/hxnYΔ*, *hxnTΔ/hxnYΔ* and *hxnShxnTΔ/hxnYΔ* multi-deletion strains. Remarkably, *hxnShxnTΔ* and *hxnShxnTΔ/hxnYΔ* mutants showed more efficient 6-NA utilization properties than the wild type control. The explanation for this surprising phenomenon can be the lack of the shared promoter region of *hxnS* and *hxnT*, since we used a single substitution cassette for the creation of the *hxnShxnTΔ* double mutant in one step. In order to prove this theory, we created a double mutant, in which the deletion did not affect the



promoter region. The new double mutant (with intact *hxnS/hxnT* promoter) showed the same improved 6-NA utilization phenotype as the old double mutants (with deleted *hxnS/hxnT* promoter). Therefore, the phenotype is independent from the presence or absence of the shared promoter region. To be able to explain this phenotype, further studies are required.

**In order to study the function of the NDC2 and NDC3 gene products, we obtained gene deletion mutants for *hxnV*, *hxnW*, *hxnX*, *hxnM* and *hxnN* and tested their nitrogen source utilization abilities.** Using Hx diagnostic media (Hx nitrogen source supplemented with Allp and 100  $\mu$ M NA or 6-NA), where only HxnS can catalyze the conversion of Hx to xanthine, **we revealed that HxnM and HxnN operates downstream to the true metabolic inducer of the pathway (which is not NA or 6-NA) while HxnV, HxnW and HxnX operates upstream to the true inducer.** When we used NA or 6-NA as nitrogen source *hxnV* $\Delta$ , *hxnX* $\Delta$  and *hxnM* $\Delta$  strains were not able to grow and *hxnW* $\Delta$  mutant together with *hxnN* $\Delta$  showed leaky phenotype. The accumulation of intermediates in *hxnV* $\Delta$  and *hxnX* $\Delta$  results in either toxicity or inhibition of the constitutive transcription factor. Taken together these data, we suppose that **HxnV and HxnX operate on one branch of the route, and are implicated in the formation of the true inducer, HxnW operates on the alternative route upstream to the true inducer, while HxnM operates on a non-splitted route downstream to the true inducer.** The leaky phenotype of *hxnN* $\Delta$  foretells that HxnN is not the only amidase responsible for the cleavage of the amide group from the supposedly opened pyridine ring.

Since we don't know the true inducer compound (we know only that it derives from the metabolization of NA, 6-NA or 2,5-DP), we could not activate the gene expression of the *hxn* genes in those deletion mutants, which lack enzymes upstream to the true inducer. In order to circumvent the problem caused by the unknown true inducer, we introduced a constitutive *hxnR* allele (*hxnR<sup>c</sup>*) into the *hxnV* $\Delta$ , *hxnX* $\Delta$ , *hxnW* $\Delta$ , *hxnM* $\Delta$  and *hxnN* $\Delta$  strains by genetic crossing. With the *hxnR<sup>c</sup>* background the expression of the *hxn* genes is independent from the production of the true inducer metabolite. As we expected, all these mutants were able to grow on Hx+Allp medium without NA-derived inducer. However, when the Hx diagnostic media was supplemented with 1 mM NA or 6-NA the *hxnV* $\Delta$  *hxnR<sup>c</sup>* mutant could not grow at all and the *hxnW* $\Delta$  *hxnR<sup>c</sup>* mutant showed a reduced growth. Interestingly, when the amount of inducer was decreased to 100  $\mu$ M, both *hxnV* $\Delta$  *hxnR<sup>c</sup>*7 and *hxnW* $\Delta$  *hxnR<sup>c</sup>*7 mutants could grow as much as the wild type. The explanation of this phenomenon is the toxic or HxnR inactivating nature of the compound accumulated in the constitutive *hxnV* $\Delta$  and *hxnW* $\Delta$  mutants. The *hxnX* $\Delta$  and *hxnM* $\Delta$  mutants also showed signs of toxicity (or inhibition of constitutive HxnR) but with lower extent than that was observed in *hxnV* $\Delta$  *hxnR<sup>c</sup>*7 and *hxnW* $\Delta$  *hxnR<sup>c</sup>*7.

We noticed that the *hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>* mutant produced a blue pigment on urea nitrogen source supplemented with 10 mM NA or 10 mM 6-NA. This phenomenon is similar to that observed in prokaryotes (*Bacillus spp.* and *Pseudomonas spp.*). The bacterial blue pigment thought to be an azaquinone compound formed by a non-enzymatic conversion of an unsaturated trihydroxylated pyridine derivative. In order to identify and compare the fungal blue pigment to that of the prokaryotic, we are currently performing GC-MS analysis on samples derived from *A. nidulans hxnVΔ hxnR<sup>c</sup>* mutant and *P. putida* NicX mutant.

We aimed to study the intracellular compartmentalization of the NA catabolic route by expressing *gfp*-fused *hxn* genes in the appropriate *hxn* deletion strains. So far we studied the intracellular localization of HxnV and HxnX. According to the *in silico* localization signal search HxnV was expected in the cytoplasm, while HxnX in the peroxisomes. **In case of HxnV-GFP we could not exclude the possibility of compartmentalization.** Further studies on the HxnV-GFP expressing strain is needed. **In case of GFP-HxnX we clearly proved the peroxisomal localization of the fused protein, by showing the co-localization of GFP-HxnX with PTS-tagged mRFP.**

In order to unravel the chemical structure of the pathway related compounds, in collaboration with a chemist expert Dr. Mónika Varga (operating at the analytical work station of the Department of Microbiology at USz) we performed GC-MS and HPLC-MS analyses on samples obtained from cultures of constitutive single and multiple-deletion mutants incubated with NA or 6-NA substrates after pregrowth. The multiple deletion mutants were created by genetic crosses (*hxnMΔ/hxnXΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ*, *hxnMΔ/hxnWΔ*).

Although the preliminary GC-MS and HPLC-MS experiments has already provided valuable data for the uncovering of certain features of the NA catabolic pathway, the identification of each step of the pathway remains a challenging and robust work done in the near future.

The primary component analysis of the metabolites obtained from the *hxnXΔ*, *hxnWΔ*, *hxnVΔ* and *hxnMΔ* simple and the *hxnMΔ/hxnXΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ* and *hxnMΔ hxnWΔ* double deletion mutants confirmed the existence of the alternative route as each double mutant clusterized with the simple *hxnMΔ* mutant, which indicates that the lack of *hxnV*, *hxnX* or *hxnW* is not enough to terminate the degradation.

The investigation of *hxnSΔ*, *hxnTΔ* and *hxnYΔ* simple and their multiple deletion mutants supported that the NA degradation pathway of *A. nidulans* splits to alternative routes. Based on the clusterization of the primary components of the *hxnSΔ*, *hxnTΔ* and *hxnYΔ* simple

and their multiple deletion mutants we can propose that HxnS operates upstream to HxnY and HxnT operates downstream to HxnY on a route, which is alternative to that involving HxnW. We observed that most of the metabolites accumulated in more than one mutants, only 2,5-DP and an unidentified compound with 131 g/mol molecule weight (Mw131) could be found exclusively in single mutants. 2,5-DP was exclusively found in the *hxnVΔ* strain, that clearly suggests that the **2,5-DP is the substrate of HxnV**. The Mw131 compound was exclusively found in the *hxnWΔ* strain, which indicates that **Mw131 is the substrate of HxnW**. **We proposed that Mw131 is a 1,2,3,6-tetrahydropyridine-2,3,6-triol**, which is a more saturated derivative of the intermediate 2,3,6-trihydropyridine compound of the prokaryotic routes (in *Bacillus* and *Pseudomonas spp.*).

In summary, our results significantly contributed to the understanding of NA catabolic pathway, and proved that the eukaryotic route is different from those found in prokaryotes in many aspects. They are the split of the pathway to alternative routes and production of intermediate compounds that were not detected in the prokaryotic routes. Despite of our achievements, further research is needed for the complete understanding of each step of the pathway.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Al-Mohaissen MA, Pun SC & Frohlich JJ (2010) Niacin: from mechanisms of action to therapeutic uses. *Mini Rev Med Chem* **10**: 204-217.
- Alhapel A, Darley DJ, Wagener N, Eckel E, Elsner N & Pierik AJ (2006) Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in *Eubacterium barkeri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12341-12346.
- Ámon J (2018) Az első eukarióta nikotinsav hasznosítási útvonal felderítése, szabályozása és az útvonal enzimeinek vizsgálata *Aspergillus nidulans* modellszervezetben PhD értekezés Thesis, University of Szeged, Szeged.
- Ámon J, Fernandez-Martin R, Bokor E és mtsai. (2017) A eukaryotic nicotinate-inducible gene cluster: convergent evolution in fungi and bacteria. *Open Biol* **7**.
- Antal Z, Manczinger L & Ferenczy L (1997) Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology Techniques* **11**: 205-208.
- Behrman EJ & Stanier RY (1957) The bacterial oxidation of nicotinic acid. *J Biol Chem* **228**: 923-945.
- Bennett JW & Papa KE (1988) The aflatoxigenic *Aspergillus* species. *Advances in Plant Pathology*, Vol. 6 ed.^eds.), p.^pp. 263–280.
- Bhattacharjee N, Feliks M, Shaik MM & Field MJ (2017) Catalytic Mechanism of Peptidoglycan Deacetylase: A Computational Study. *J Phys Chem B* **121**: 89-99.
- Boyer JH & Kruger S (1957) Azaquinones. I. Oxidation of Certain Hydroxy- and Aminopyridones. *Journal of the American Chemical Society* **79**: 3552-3554.
- Coughlan MP, Mehra RK, Barber MJ & Siegel LM (1984) Optical and electron paramagnetic resonance spectroscopic studies on purine hydroxylase II from *Aspergillus nidulans*. *Arch Biochem Biophys* **229**: 596-603.
- Enroth C (2003) High-resolution structure of phenol hydroxylase and correction of sequence errors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 1597-1602.
- Ensign & Rittenberg (1964) The Pathway of Nicotinic Acid Oxidation by a *Bacillus* Species. *J Biol Chem* **239**: 2285-2291.
- Ensign JC & Rittenberg SC (1963) A Crystalline Pigment Produced from 2-Hydroxypyridine by *Arthrobacter Crystallopoietes* N.Sp. *Arch Mikrobiol* **47**: 137-153.
- Ferenczy L, Kevei F & Szegedi M (1975) Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia* **31**: 50-52.

- Fetzner S (1998) Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 633-657.
- Fogarty WM (1994) Enzymes of the Genus *Aspergillus*. *Aspergillus. Biotechnology Handbooks*, Vol. vol 7. (Smith JE, ed.^eds.), p.^pp. Springer, Boston, MA.
- Glatigny A & Scazzocchio C (1995) Cloning and molecular characterization of *hxA*, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **270**: 3534-3550.
- Goldman GH & Kafer E (2004) *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. *Fungal Genet Biol* **41**: 428-442.
- Gurvitz A, Rottensteiner H, Kilpelainen SH és mtsai. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase is encoded by the oleate-inducible gene *SPS19*. *J Biol Chem* **272**: 22140-22147.
- Hicks KA, Yuen ME, Zhen WF, Gerwig TJ, Story RW, Kopp MC & Snider MJ (2016) Structural and Biochemical Characterization of 6-Hydroxynicotinic Acid 3-Monooxygenase, A Novel Decarboxylative Hydroxylase Involved in Aerobic Nicotinate Degradation. *Biochemistry* **55**: 3432-3446.
- Holesova Z, Jakubkova M, Zavadiakova I, Zeman I, Tomaska L & Nosek J (2011) Gentisate and 3-oxoadipate pathways in the yeast *Candida parapsilosis*: identification and functional analysis of the genes coding for 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase and 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase. *Microbiology* **157**: 2152-2163.
- Ikeda M, Tsuji H, Nakamura S, Ichiyama A, Nishizuka Y & Hayaishi O (1965) Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide. Ii. A Role of Picolinic Carboxylase in the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide from Tryptophan in Mammals. *J Biol Chem* **240**: 1395-1401.
- Jimenez JL, Canales A, Jimenez-Barbero J, Ginalska K, Rychlewski L, Garcia JL & Diaz E (2008) Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 11329-11334.
- Kavanagh KL, Jornvall H, Persson B & Oppermann U (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* **65**: 3895-3906.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN & Sternberg MJ (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**: 845-858.

- Kevei F & Peberdy JF (1977) Interspecific Hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by Fusion of Somatic Protoplasts. *Journal of General Microbiology* **102**: 255-262.
- Larionov A, Krause A & Miller W (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6**: 62.
- Lewis NJ, Hurt P, Sealy-Lewis HM & Scazzocchio C (1978) The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. IV. A comparison between purine hydroxylase I and II. *Eur J Biochem* **91**: 311-316.
- Liu X, Yuan Z, Adam Yuan Y, Lin J & Wei D (2011) Biochemical and structural analysis of Gox2181, a new member of the SDR superfamily from *Gluconobacter oxydans*. *Biochem Biophys Res Commun* **415**: 410-415.
- MacKay D, Hathcock J & Guarneri E (2012) Niacin: chemical forms, bioavailability, and health effects. *Nutr Rev* **70**: 357-366.
- Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF (1982) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mehra RK & Coughlan MP (1989) Characterization of purine hydroxylase I from *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **135**: 273-278.
- Mileni M, Johnson DS, Wang Z és mtsai. (2008) Structure-guided inhibitor design for human FAAH by interspecies active site conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 12820-12824.
- Nakano H, Wieser M, Hurh B, Kawai T, Yoshida T, Yamane T & Nagasawa T (1999) Purification, characterization and gene cloning of 6-hydroxynicotinate 3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* TN5. *Eur J Biochem* **260**: 120-126.
- Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE és mtsai. (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566.
- Osharov N & May G (2000) Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* **155**: 647-656.
- Osmani SA & Mirabito PM (2004) The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **41**: 401-410.
- Pelczar MJ & Porter JR (1940) Utilization of Nicotinic Acid and Related Pyridine Compounds by the Proteus Group of Organisms. *J Bacteriol* **39**: 429-435.
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD & Bufton AW (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**: 141-238.

- Said HM (2011) Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J* **437**: 357-372.
- Scazzocchio C (1973) The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. II. Use of NADH dehydrogenase activity associated with xanthine dehydrogenase to investigate substrate and product inductions. *Mol Gen Genet* **125**: 147-155.
- Scazzocchio C, Holl FB & Fogelman AI (1973) The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Allopurinol-resistant mutants constitutive for xanthine-dehydrogenase. *Eur J Biochem* **36**: 428-445.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M & Witholt B (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.
- Schroeder HW & Kelton WH (1975) Production of sterigmatocystin by some species of the genus *Aspergillus* and its toxicity to chicken embryos. *Appl Microbiol* **30**: 589-591.
- Sealy-Lewis HM, Scazzocchio C & Lee S (1978) A mutation defective in the xanthine alternative pathway of *Aspergillus nidulans*: its use to investigate the specificity of *uaY* mediated induction. *Mol Gen Genet* **164**: 303-308.
- Sealy-Lewis HM, Lycan D & Scazzocchio C (1979) Product induction of purine hydroxylase II in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **174**: 105-106.
- Shaik MM, Cendron L, Percudani R & Zanotti G (2011) The structure of *Helicobacter pylori* HP0310 reveals an atypical peptidoglycan deacetylase. *PLoS One* **6**: e19207.
- Shi YW, Cui LF & Yuan JM (2007) Gene cloning, expression, and substrate specificity of an imidase from the strain *Pseudomonas putida* YZ-26. *Curr Microbiol* **55**: 61-64.
- Shin S, Lee TH, Ha NC és mtsai. (2002) Structure of malonamidase E2 reveals a novel Ser-cisSer-Lys catalytic triad in a new serine hydrolase fold that is prevalent in nature. *EMBO J* **21**: 2509-2516.
- Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latge JP & Steinbach WJ (2014) *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**: a019786.
- Tinschert A, Kiener A, Heinzmann K & Tschech A (1997) Isolation of new 6-methylnicotinic-acid-degrading bacteria, one of which catalyses the regioselective hydroxylation of nicotinic acid at position C2. *Arch Microbiol* **168**: 355-361.
- Wang SN, Xu P, Tang HZ és mtsai. (2004) Biodegradation and detoxification of nicotine in tobacco solid waste by a *Pseudomonas* sp. *Biotechnol Lett* **26**: 1493-1496.
- Ward OP, Qin WM, Dhanjoon J, Ye J & Singh A (2005) Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Adv Appl Microbiol* **58C**: 1-75.

- Yoshida T & Nagasawa T (2000) Enzymatic functionalization of aromatic N-heterocycles: hydroxylation and carboxylation. *J Biosci Bioeng* **89**: 111-118.
- Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominguez Y & Scazzocchio C (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**: 973-981.



## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszékének vezetőjének szeretném megköszönni a lehetőséget, hogy szakdolgozói, és PhD munkámat a tanszéken végezhessem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Hamari Zsuzsannának támogatásáért és a rengeteg segítségért amit az elmúlt 7 évben nyújtott számomra.

Köszönöm Dr. Karácsony Zoltánnak türelmét és segítségét szakdolgozói munkám során és PhD éveim kezdetén, mely idő alatt laboratóriumi alapismereteimet elsajátíthattam. Köszönöm szépen Dr. Gácsér Attilának és Dr. Németh Tibornak az évek során nyújtott segítségéért és hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Külön köszönettel tartozom Ámon Juditnak a kísérleteim elvégzéséhez nyújtott segítségéért. Nagyon köszönöm Dr. Varga Mónikának az analitikai vizsgálatok elvégzéséhez nyújtott segítségét. Köszönöm Michel Flipphe-nek segítségét az *in silico* analízisekhez.

Köszönettel tartozom a 301-es labor valamennyi volt és jelenlegi dolgozójának, különösképpen Szenzenstein Juditnak, Papp Csabának, Dr. Grózer Zsuzsannának, Dr. Tóth Adélnak, Dr. Tóth Renátának, Csonka Katalinnak, Zajta Eriknek, Pál Sárának és Bohner Flórának, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért és laboruk tagjaként tekintettek rám. Köszönettel tartozom Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának, hogy technikai kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzájuk, Lengyel Boglárkának és Csordás Anitának pedig a gazdasági ügyek intézéséért.

Szeretném továbbá megköszönni Tóth Eszternek, Kartali Tündének, Szebenyi Csillának, Dr. Nyilasi Ildikónak és Dr. Csernetics Árpádnak a barátságukat és támogatásukat. Köszönettel tartozom emellett barátaimnak, akik mindig támogattak.

Külön köszönöm Családomnak, elsősorban Szüleimnek az életem során nyújtott rengeteg szeretetet és támogatást, amely nélkül nem jutottam volna el idáig és nagyon köszönöm Páromnak, Baksa Zoltánnak a kitartó támogatást, és sok türelmet, mellyel nagyban hozzájárult dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom a Mikrobiológiai Tanszék minden volt és jelenlegi dolgozójának, akik bármilyen formában segítettek dolgozatom elkészítéséhez.

Jelen kutatás az OTKA-K101218, NKFI-K16 119516, a GINOP-2.3.2-15-2016-00035 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 pályázatok támogatásával valósulhatott meg.

# 11. MELLÉKLETEK

## 1. melléklet

### Felhasznált *A. nidulans* törzsek

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.106	<i>hxnSA::zeo, hxAΔ::zeo, pyrG89, pantoB100, biA1, veA1, pyr4 in trans</i>	szülői törzs keresztezéshez	(Ámon, 2018)
HZS.120	<i>riboB2, pabaA1, veA1</i>	vad típusú kontroll a növekedési tesztekhez	(Hamari és mtsai., 2009)
HZS.123	<i>anA1, riboB2, pabaA1, veA1</i>	szülői törzs keresztezéshez	(Ámon, 2018)
HZS.125	<i>pyrG89; yA2, veA1</i>	szülői törzs keresztezéshez	jelen munka
HZS.135	<i>hxB20, biA1, veA1</i>	növekedési tesztek	(Ámon és mtsai., 2017)
HZS.136	<i>hxnRA::zeo; pantoB100, veA1</i>	kontroll törzs GC-MS analízishez	(Ámon és mtsai., 2017)
HZS.145	<i>veA1</i>	vad típusú kontroll a Southern-hibridizációk során	(Ámon és mtsai., 2017)
HZS.220	<i>hxnPA::riboB<sup>+</sup>, riboB2, hxnR80, pyroA4, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, veA1</i>	növekedési tesztek	(Ámon és mtsai., 2017)
HZS.222	<i>hxnTA::pabaA<sup>+</sup>; riboB2 pabaA1, veA1</i>	szülői törzs keresztezéshez, növekedési tesztek	(Ámon, 2018)
HZS.223	<i>hxnYA::riboB<sup>+</sup>, pabaA1, riboB2, veA1</i>	többszörösen deléciós mutánsok létrehozása	(Ámon, 2018)
HZS.250	<i>hxnSA::zeo, biA1, veA1</i>	kontroll törzs GC-MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.106×HZS.122 keresztezésből)
HZS.251	<i>riboB2, biA1, pabaA1, veA1</i>	transzformációs recipiens törzs deléciós törzsek létrehozásához	jelen munka (utód a HZS.106×HZS.122 keresztezésből)
HZS.257	<i>hxn6, pyrG89, yA2, veA1</i>	recipiens törzs a génbank transzformáláshoz	jelen munka (utód a CS308×HZS.125 keresztezésből)
HZS.267	<i>riboB2, pantoB100, veA1</i>	transzformációs recipiens törzs deléciós törzsek létrehozásához	jelen munka (utód a HZS.308×HZS.227 keresztezésből)
HZS.287	<i>hxnNA::riboB<sup>+</sup>, biA1, pabaA1, (riboB2), veA1</i>	deléciós mutáns	jelen munka (HZS.251 trf/5)
HZS.288	<i>hxnNA::riboB<sup>+</sup>, pyroA4, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, (riboB2), veA1</i>	növekedési tesztek	jelen munka (TN02 A21 trf/1)
HZS.289	<i>hxnNA::riboB<sup>+</sup>, pyroA4, nkuAΔ::argB, (riboB2), veA1</i>	létrehozott deléciós törzs, növekedési tesztek (nem bemutatott eredmények)	jelen munka (TN02 A21 trf/2)
HZS.290	<i>hxnNA::riboB<sup>+</sup>, pyroA4, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, (riboB2), veA1</i>	létrehozott deléciós törzs növekedési tesztek (nem bemutatott eredmények)	jelen munka (TN02 A21 trf/5)

HZS.291	<i>hxnMΔ::riboB<sup>+</sup>, biA1, pabaA1, (riboB2), veA1</i>	létrehozott deléciós törzs növekedési tesztek (nem bemutatott eredmények)	jelen munka (HZS.251 trf/2)
HZS.292	<i>hxnMΔ::riboB<sup>+</sup>, biA1, pabaA1, (riboB2), veA1</i>	létrehozott deléciós törzs növekedési tesztek (nem bemutatott eredmények)	jelen munka (HZS.251 trf/5)
HZS.293	<i>hxnMΔ::riboB<sup>+</sup>, pantoB100, (riboB2), veA1</i>	növekedési tesztek	jelen munka (HZS.267 trf/3)
HZS.294	<i>hxnVΔ::riboB<sup>+</sup>, pyroA4, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, (riboB2), veA1</i>	növekedési tesztek	jelen munka (TN02 A21 trf/1)
HZS.295	<i>hxnVΔ::riboB<sup>+</sup>, pyroA4, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, (riboB2), veA1</i>	létrehozott deléciós törzs növekedési tesztek (nem bemutatott eredmények)	jelen munka (TN02 A21 trf/2)
HZS.296	<i>hxnXΔ::riboB<sup>+</sup>, biA1, pabaA1, (riboB2), veA1</i>	növekedési tesztek	jelen munka (HZS.251 trf/4)
HZS.297	<i>hxnXΔ::riboB<sup>+</sup>, biA1, pabaA1, (riboB2), veA1</i>	létrehozott deléciós törzs növekedési tesztek (nem bemutatott eredmények)	jelen munka (HZS.251 trf/7)
HZS.304	<i>hxnVΔ::riboB<sup>+</sup>, pantoB100, pyroA4, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, (riboB2), veA1</i>	szülői törzs <i>hxnV-gfp</i> transzformáláshoz	jelen munka (utód a HZS.294×HZS.227 keresztezésből)
HZS.306	<i>hxnNΔ::riboB<sup>+</sup>, pyroA4, hxnR<sup>c</sup>7, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, (riboB2), veA1</i>	konstitutív mutáns növekedési teszthez és GC-MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.288×HZS.219 keresztezésből)
HZS.307	<i>hxnR<sup>c</sup>7, pantoB100, biA1, veA1</i>	konstitutív mutáns keresztezéshez	jelen munka (utód a HZS.293×HZS.219 keresztezésből)
HZS.308	<i>hxnMΔ::riboB<sup>+</sup>, pantoB100, hxnR<sup>c</sup>7, (riboB2), veA1</i>	konstitutív mutáns növekedési teszthez és GC-MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.293×HZS.219 keresztezésből)
HZS.309	<i>hxnVΔ::riboB<sup>+</sup>, pyroA4, hxnR<sup>c</sup>7, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, (riboB2), veA1</i>	konstitutív mutáns növekedési teszthez és GC-MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.294×HZS.219 keresztezésből)
HZS.310	<i>hxnXΔ::riboB<sup>+</sup>, hxnR<sup>c</sup>7, (riboB2), veA1</i>	konstitutív mutáns növekedési teszthez és GC-MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.296×HZS.316 keresztezésből)
HZS.316	<i>hxnR<sup>c</sup>7, pyroA4, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, veA1</i>	konstitutív mutáns keresztezéshez	jelen munka (utód a HZS.288×HZS.219 keresztezésből)
HZS.393	<i>hxnWΔ::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), pantoB100, veA1</i>	növekedési tesztek	jelen munka (HZS.267 trf/12)
HZS.394	<i>hxnWΔ::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), pantoB100, veA1</i>	létrehozott deléciós törzs növekedési tesztek (nem bemutatott eredmények)	jelen munka (HZS.267 trf/15)

HZS.404	<i>riboB2, pantoB100, hxnR<sup>c</sup>7, veA1</i>	transzformációs recipiens törzs deléciós törzsek létrehozásához	jelen munka (utód a HZS.307×HZS.123 keresztezésből)
HZS.427	<i>hxnTA::pabaA<sup>+</sup>, (pabaA1), riboB2, anA1, hxnR<sup>c</sup>7, veA1</i>	GC-MS/HPLC-MS analízis	(Ámon, 2018)
HZS.429	<i>hxnYA::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), pabaA1, biA1, hxnR<sup>c</sup>7, veA1</i>	GC-MS/HPLC-MS analízis	(Ámon, 2018)
HZS.517	<i>hxnWA::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), pantoB100, hxnR<sup>c</sup>7, veA1</i>	konstitutív mutáns növekedési teszthez és GC-MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.394×307 keresztezésből)
HZS.534	<i>hxnXA::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), 1 db ektopikus pDsRed-SKL-argB plazmid, pantoB100, biA1, pabaA1, veA1</i>	fluoreszcens mikroszkópia	jelen munka (utód a HZS.305×NA1322 keresztezésből)
HZS.548	<i>hxnSA::pabaA<sup>+</sup>, pabaA1, anA1, riboB2, veA1</i>	növekedési tesztek, többszörösen deléciós mutánsok létrehozása	jelen munka (HZS. 123 trf/9)
HZS.549	<i>hxnSA::pabaA<sup>+</sup>, pabaA1, anA1, riboB2, veA1</i>	létrehozott deléciós törzs növekedési tesztek (nem bemutatott eredmények)	jelen munka (HZS. 123 trf/18)
HZS.555	<i>hxnVA::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), 1 db ektopikus pAn-PgpdA hxnV-gfp-pantoB<sup>+</sup>, pantoB100, pyroA4, nkuAA::argB<sup>+</sup>, veA1</i>	mikroszkópos vizsgálatok	jelen munka (HZS.304 trf/25)
HZS.558	<i>hxnSA::pabaA<sup>+</sup>, hxnYA::riboB<sup>+</sup>, anA1 veA1, (pabaA1), (riboB2)</i>	növekedési tesztek	jelen munka (utód a HZS.223×HZS.548 keresztezésből)
HZS.564	<i>nkuAA::argB<sup>+</sup>, pabaA1, riboB2, pyroA4, veA1</i>	transzformációs recipiens törzs deléciós törzsek létrehozásához	jelen munka (utód a TN02 A21×HZS.544 keresztezésből)
HZS.568	<i>hxnShxnTA::pabaA<sup>+</sup>, pabaA1, pyroA4, riboB2, nkuAA::argB<sup>+</sup>, veA1</i>	növekedési tesztek, többszörösen deléciós mutánsok létrehozása	jelen munka (HZS.564 trf/10)
HZS.569	<i>hxnShxnTA::pabaA<sup>+</sup>, hxnYA::riboB<sup>+</sup>, pabaA1, riboB2, (nkuAA::argB<sup>+</sup>), pyroA4, veA1</i>	növekedési tesztek	jelen munka (utód a HZS.223×HZS.568 keresztezésből)
HZS.579	<i>hxnXA::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), 1 db ektopikus pDsRed-SKL-argB plazmid, 7 db ektopikus pAn-PgpdA-hxnX-gfp-pantoB<sup>+</sup> plazmid, pantoB100, biA1, pabaA1, veA1</i>	mikroszkópos vizsgálatok	jelen munka (HZS. 534 trf/27)

HZS.582	<i>ΔhxnM::riboB<sup>+</sup>, ΔhxnX::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), pantoB100, veA1</i>	mutáns törzs GC- MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.293×HZS.297 keresztelésből)
HZS.584	<i>ΔhxnM::riboB<sup>+</sup>, ΔhxnV::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), pabaA1, biA1, veA1</i>	mutáns törzs GC- MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.294×HZS.292 keresztelésből)
HZS.588	<i>ΔhxnM::riboB<sup>+</sup>, ΔhxnW::riboB<sup>+</sup>, (riboB2), pabaA1, pantoB100, veA1</i>	mutáns törzs GC- MS/HPLC-MS analízishez	jelen munka (utód a HZS.393×HZS.292 keresztelésből)
HZS.599	<i>hxnSA::pabaA<sup>+</sup>, (pabaA1), riboB2, veA1</i>	növekedési tesztek, többszörösen deléciós mutánsok létrehozása	jelen munka (HZS.120 trf/2)
HZS.747	<i>hxnY::riboB<sup>+</sup>, hxnV::riboB<sup>+</sup>, riboB2, pabaA1, pyroA4, biA1, hxnR<sup>c</sup>7, veA1</i>	pigmentképződés vizsgálata	jelen munka (utód a HZS.429×HZS.309 keresztelésből)
HZS.748	<i>hxnT::pabaA<sup>+</sup>, hxnV::riboB<sup>+</sup>, pabaA1, riboB2, anA1, hxnR<sup>c</sup>7, veA1</i>	pigmentképződés vizsgálata	jelen munka (utód a HZS.427×HZS.537 keresztelésből)
HZS.749	<i>hxnWhxnVΔ::riboB<sup>+</sup>, riboB2, pantoB100, hxnR<sup>c</sup>7, veA1</i>	pigmentképződés vizsgálata	jelen munka (HZS.404 trf/1)
HZS.750	<i>hxnXhxnWhxnVΔ::riboB<sup>+</sup>, riboB2, pantoB100, hxnR<sup>c</sup>7, veA1</i>	pigmentképződés vizsgálata	jelen munka (HZS.404 trf/5)
TNO2 A21	<i>riboB2, pyroA4, nkuAΔ::argB<sup>+</sup>, veA1</i>	növekedési tesztek	(Nayak és mtsai., 2006)
FGSC A872	<i>hxnR<sup>c</sup>7, biA1, veA1</i>	<i>hxnR<sup>c</sup>7</i> dupla deléciós mutánsok létrehozása	(Scazzocchio és mtsai., 1973)
CS308	<i>pyroA4, hxn6, veA1</i>	szülői törzs keresztezéshez	Scazzocchio törzsgyűjtemény

A táblázatban feltüntetett *Aspergillus nidulans* törzsek genotípusának leírása során használt, a kísérleteink szempontjából fontosabb jelölések magyarázata:

- *anA1*: tiamin auxotrófia
- *argB2*: arginin auxotrófia
- *biA1*: biotin auxotrófia
- *pabaA1*: para-amino-benzoésav auxotrófia
- *pantoB100*: pantoténsav auxotrófia
- *pyroA4*: piridoxin auxotrófia
- *riboB2*: riboflavin auxotrófia
- *pyrG89*: a *pyrG* gén mutációja, mely hatása a növekedési képtelenség uracil és uridin hiányában
- *veA1*: ivartalan spóráképzés fény hiányában is

- *yA2*: *yelA*-ban (para-difenol oxidáz) történt mutáció, melynek következtében a pigmentszintézis sérül, ami sárga konídiumokat eredményez (Clutterbuck, 1972)
- *nkuA*: a kettős szálú DNS törések esetén a nem-homológ végek összekapcsolását végző javító mechanizmusokhoz szükséges (Nayak és mtsai, 2006); mutációja transzformálás során csökkenti az ektopikus integrációk lehetőségét
- *pDsRed-SKL-argB*: peroxisómával fuzionált vörös fluoreszcens protein
- *hxnR<sup>c</sup>7*: *hxnR* gént konstitutívan, indukció hiányában is kifejező mutáció

Ámon J, Fernandez-Martin R, Bokor E, Cultrone A, Kelly JM, Flippi M, Scazzocchio C, Hamari Z (2017) A eukaryotic nicotinate-inducible gene cluster: convergent evolution in fungi and bacteria. *Open Biol* **7**.

Ámon J (2018) Az első eukarióta nikotinsav hasznosítási útvonal felderítése, szabályozása és az útvonal enzimeinek vizsgálata *Aspergillus nidulans* modellszervezetben PhD értekezés Thesis, University of Szeged, Szeged.

Clutterbuck AJ (1972) Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **70**: 423-435.

Hamari Z, Amillis S, Drevet C, Apostolaki A, Vagvolgyi C, Diallinas G & Scazzocchio C (2009) Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **73**: 43-57.

Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566.

Scazzocchio C, Holl FB & Fogelman AI (1973) The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Allopurinol-resistant mutants constitutive for xanthine-dehydrogenase. *Eur J Biochem* **36**: 428-445.

## 2. melléklet

### Alkalmazott *Escherichia coli* törzs

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB<sup>+</sup> Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>	vektorkonstrukciók felszaporítása	<a href="http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#JM109">http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#JM109</a>

### 3. melléklet

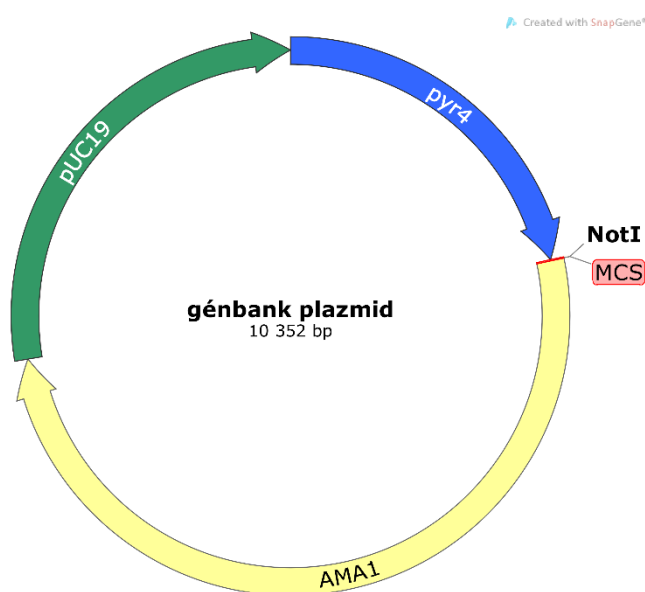
#### Felhasznált vektorok

##### A: GFP-fúziós konstrukciókhoz felhasznált vektorok

Név	Felhasználás	Hivatkozás
pAN-HZS-1	pAN-HZS-12 és pAN-HZS-13 vektorok létrehozása	(Karácsony és mtsai., 2015)
pAN-HZS-12	<i>hxnV-gfp</i> fúziós konstrukció létrehozása	jelen munka, 5.11.1. alfejezet
pAN-HZS-13	<i>gfp-hxnX</i> fúziós konstrukció létrehozása	jelen munka, 5.11.2. alfejezet

Karácsony Z, Gácsér A, Vágvölgyi C & Hamari Z (2015) Further characterization of the role of the mitochondrial high-mobility group box protein in the intracellular redox environment of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **161**: 1897-1908.

##### B: *A. nidulans* génbank transzformálás során alkalmazott vektor



- *pyr4*: *Neurospora crassa* vad típusú allélje, mely komplementálja az *A. nidulans* *pyrG89* auxotrófiáját
- pUC19: *E. coli* replikációs origó
- AMA1: autonóm replikációt és hatékonyabb transzformációt biztosító *A. nidulans* szekvencia
- MCS: Multi Cloning Site, az *A. nidulans* genomszakaszok NotI hasítóhelyre történő beklónozásának pozíciója

#### 4. melléklet

##### Alkalmazott indítószekvenciák

<b>Génbankkal transzformált <i>hxn6</i> törzs szekvenálásához használt indítószekvenciák</b>	
T3	5' - aattaaccctcactaaagg - 3'
T7	5' - cattatgctgagtatatccg - 3'
walk AN9162down frw1	5' - tagattggtttaagcgagcg - 3'
walk AN9162 down frw2	5' - ccaaacgcaggacgaatatacac - 3'
walk AN9162 down frw3	5' - ccctgctcacaaactatcct - 3'
walk AN9162 frw4	5' - atgctgaatcttcgaggag - 3'
hxnV down frw	5' - gtttgcgaagccttggtcgtg - 3'
hxnW upst rev	5' - gtgttcttgccgagcgatgcc - 3'
hxnW AS frw	5' - gcagatcgtggtgttctcgtag - 3'
hxnV upst nest frw	5' - caagggtgaactgcttcgctagg - 3'
hxnV upst rev	5' - caagacgggtgggtggaggagt - 3'
hxnV upst seq	5' - atccgctcaatattcattg - 3'
hxnW down frw	5' - cagcactgtaccactgcgag - 3'
hxnV down rev	5' - gatcagactagtgtagtgttactaac - 3'
hxnX F366	5' - gtctgagcgagcagatccag - 3'
hxnX F716	5' - cacaggtcaactactggcttg - 3'
hxnX F1066	5' - gctgccatacttagcatctg - 3'
hxnV F513	5' - tcggaccctgatatttctc - 3'
hxnV F 740	5' - ggagttcatccctgatgcgc - 3'
hxnV F1016	5' - ctaaggcaacaccgcaatatg - 3'
hxnV F1449	5' - gatcgcaaacgacctcattg - 3'
hxnV F1811	5' - cgacgtccattctagcaatttctg - 3'
hxnV F2016	5' - gactgtgtatctggatgatg - 3'
hxnV ReTi rev	5' - gaaatgaactatttcgctgaacag - 3'
hxnV stop 307 frw	5' - gatgatcaatgcatacagcactaccac - 3'
<b>A <i>hxnV</i> gén cDNS régiójának felsokszorozására használt indítószekvenciák</b>	
hxnV cDNA UJ EcoRI frw	5' - tttttttgaattcatgaagcgactgcctctcaagc - 3'
hxnV cDNA PstI rev	5' - tttttttctgcagtcacaagaagaatccaaaatactcctc - 3'
<b>A <i>hxnV</i> cDNS régiójának szekvenálásához használt indítószekvenciák</b>	
hxnV seq 13F	5' - cagatcacgaccaaggcttc - 3'
hxnV seq 492F	5' - gtaatgagctgagcgacccttc - 3'
hxnV F513	5' - tcggaccctgatatttctc - 3'
hxnV F1016	5' - ctaaggcaacaccgcaatatg - 3'
hxnV F1811	5' - cgacgtccattctagcaatttctg - 3'
<b>Géndelációkhoz alkalmazott indítószekvenciák</b>	
hxnS rup frw	5' - gtgtactgttcatcacgccaag - 3'
hxnS rup rev	5' - cttgctgttgagacgacttg - 3'
hxnS rpaba kim frw	5' - ccaagtcgtctccaacagcaaggcacatagctattacagtgatttgagac - 3'
hxnS rpaba kim rev	5' - catcgccacagctcaagttctgtagtttgctgaatggctaacgaggcattg - 3'
hxnT paba kim rev	5' - ctatctgtattctgtgtcgtagtattcgtgtagtttgctgaatggctaacgaggcattg - 3'
hxnS rdown frw	5' - agaacttgagctgtggcgatg - 3'
hxnS rdown rev	5' - agagatacagaacatgcatttctccc - 3'
hxnT down frw	5' - gaatactacgacacagaatacagatagac - 3'
hxnT down rev	5' - catagtcttaaccacgagacgatcagtaac - 3'
hxnS rup nest frw	5' - cagttgagcgatcttgatgtgag - 3'
hxnT rev	5' - ctattgagcgaaagggtagtccttatag - 3'
hxnT down nest rev	5' - tctgttctactacaggcagcgagtttctg - 3'
hxnV upst frw	5' - acttctcaactgctcgcgtcc - 3'
hxnV upst rev	5' - caagacgggtgggtggaggagt - 3'
hxnV upst nest frw	5' - caagggtgaactgcttcgctagg - 3'
hxnV down nest rev	5' - cgaaattgttctctgcaactggg - 3'
hxnV ribokim frw	5' - actctccaccaccgtcttgcgtacgtagttagattcaggcacattgaagcg - 3'
hxnV ribokim rev	5' - cagcaccaaggcttcgcaaacggaaactgcatgactactaggtggtgctatc - 3'

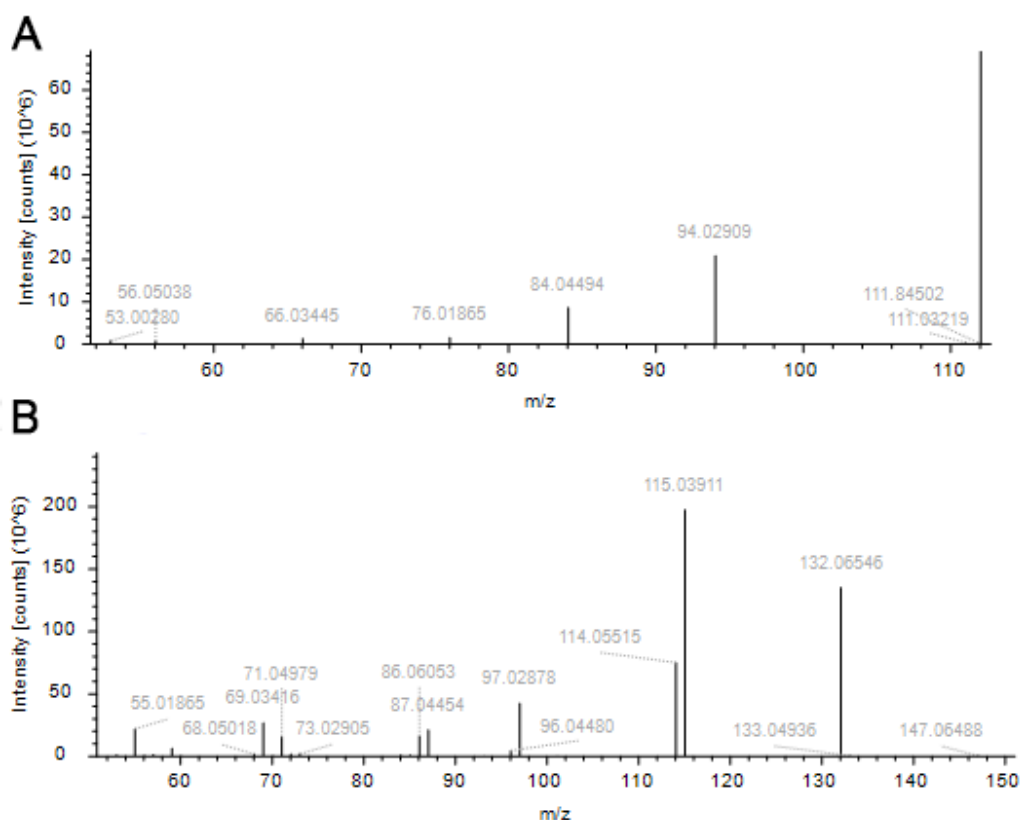


hxnV down frw	5' - gtttgcgaagccttggtcgtg - 3'
hxnV down rev	5' - ctgagacgtcagtgaggacat - 3'
hxnV AS frw	5' - cagcgtcaagtctcatatctatactg - 3'
hxnV AS rev	5' - cagagcacgggtacaagaaggtg - 3'
hxnW upst frw	5' - actcctccaccaccgtcttg - 3'
hxnW upst rev	5' - gtgttcttggcgagcgatgcc - 3'
hxnW ribokim frw	5' - ggcatcgctcgccaagaacaccgtacgtagtgtagattcaggcacattgaagcg - 3'
hxnW ribokim rev	5' - ctcgcagtggtacagtgctgggaaaactgccatgactactaggtggtgctatc - 3'
hxnW down frw	5' - cagcactgtaccactgcgag - 3'
hxnW down rev	5' - gatcagactagtgtctagtgttactaac - 3'
hxnW down nest rev	5' - ccatgaaatggattgtaaacctcaag - 3'
hxnW AS frw	5' - gcagatcggtgttcttcctag - 3'
hxnW AS rev	5' - ctcgcagtggtacagtgctg - 3'
hxnX upst nest frw	5' - caccttcttgtaccctgtcctg - 3'
hxnX ribokim frw	5' - cccagttgcagagaaacaatttcgcgtacgtagtgtagattcaggcacattgaagcg - 3'
hxnX ribokim rev	5' - gatgtactctgttctctgtattcaacggaaaactgccatgactactaggtggtgctatc - 3'
hxnX down frw	5' - gttgaatcagaggaacaggtagcatc - 3'
hxnX down rev	5' - gagactgtactcttatcgttcg - 3'
hxnX frw	5' - cgacagctattgctgcggac - 3'
hxnN upst frw	5' - cgtagaggctgtttcatgtcctg - 3'
hxnN upst rev	5' - cgtttcttggcactgtctgctc - 3'
hxnN ribokim frw	5' - gagcagacagtcgaaagaacgcgtacgtagtgtagattcaggcacattgaagcg - 3'
hxnN ribokim rev	5' - ctagccgttcccaattacctgcggaaaactgccatgactactaggtggtgctatc - 3'
hxnN down frw	5' - gcaggttaattgggaaacggctag - 3'
hxnN down rev	5' - gatgcacagattgtgaaacgattg - 3'
hxnN down nest rev	5' - gctcttaaactcatcgcacatctg - 3'
hxnN upst nest frw	5' - cggagaatatgtggttcgagc - 3'
hxnM upst frw	5' - ctattgtagtagcattcattgtcgc - 3'
hxnM upst rev	5' - cgacaccgtaggatacagagaac - 3'
hxnM ribokim frw	5' - gttctcgtatcctacgggtgcgcgtacgtagtgtagattcaggcacattgaagcg - 3'
hxnM ribokim rev	5' - gctcttaaactcatcgcacatctgggaaaactgccatgactactaggtggtgctatc - 3'
hxnM down frw	5' - cagatgtgcgatgagtttaagac - 3'
hxnM down rev	5' - ggcgaaactgagtagcagtg - 3'
hxnM upst nest frw	5' - cgaatcccgcgaagcattctg - 3'
hxnM down nest rev	5' - gatgtccgggtattcgggtcgag - 3'
<b>PCR előszelektiókhoz alkalmazott indítószekvenciák</b>	
hxnT prom frw2	5' - gattctcggctatgtagagcagg - 3'
hxnT prom rev2	5' - gcctgcatggacaagctatttag - 3'
hxnS ReTi frw	5' - gagcatttctatcttgagacga - 3'
hxnS ReTi rev	5' - ccattgtgttctgggtactg - 3'
hxnT frw	5' - ctttgcgctgcagcaccgtgtgtccaag - 3'
hxnT rev	5' - ctattgagcgaaagggtagtcctatag - 3'
hxnV AS frw	5' - cagcgtcaagtctcatatctatactg - 3'
hxnV AS rev	5' - cagagcacgggtacaagaaggtg - 3'
hxnX frw	5' - cgacagctattgctgcggac - 3'
hxnX NotI rev	5' - tttttttgcggccgctcataaccgcgatgctacgttc - 3'
hxnW AS frw	5' - gcagatcggtgttcttcctag - 3'
hxnW AS rev	5' - ctcgcagtggtacagtgctg - 3'
hxnM ReTi frw	5' - aagacctaccgcatgattacag - 3'
hxnM ReTi rev	5' - cagcaattccgtcatctcct - 3'
hxnN ReTi frw	5' - cattgcatggttctatcttggg - 3'
hxnN ReTi rev	5' - atccatacaatcccagaatgct - 3'
<b>GFP fúziós törzsek készítéséhez alkalmazott indítószekvenciák</b>	
hxnV NcoI frw	5' - tttttttccatggagcgcaactgcctctcaag - 3'
hxnV GFP linker NcoI rev	5' - tttttttccatggatcaagatcgactgtatcaataagcaagaagaatccaaatactcctccac - 3'
1pGPD int frw	5' - cagtatttcatcttcccatccaagaac - 3'
10GFP linker hmgB rev	5' - atcaagatcgactgtatcaataagctgtacagctcgtccatgccgtg - 3'
linker kim hxnX frw	5' - acaag ctattgatacagtcgatcttggat atgccatcccagttgcagagaaac - 3'

hxnW down nest rev	5' - ccatgaaatggattgtaaacctcaag - 3'
5GFP NcoI start frw	5' - ttttttccatgggtgagcaagggcgaggagc - 3'
hxnX NotI rev	5' - ttttttgcggccgctcataaccgcgatgctacctgttc - 3'
<b>Southern-hibridizációnál használt jelölt próbák elkészítéséhez használt indítószekvenciák</b>	
hxnS rdown frw	5' - agaacttgagctgtggcgatg - 3'
hxnT rev	5' - ctattgagcgaaagggtagtccgtatag - 3'
hxnS rup nest frw	5' - cagttgaggcatcttgatgtgag - 3'
hxnS rup rev	5' - ctgctgttggagacgacttgg - 3'
hxnT down frw	5' - gaatactacgacacagaatacagatagac - 3'
hxnT down rev	5' - catagtcttaaccacgagacgatcagtaac - 3'
hxnV upst nest frw	5' - caagggtgaactgcttcgctagg - 3'
hxnV upst rev	5' - caagacgggtgggtggaggagt - 3'
hxnV AS frw	5' - cagcgtcaagtctcatatctatactg - 3'
hxnV down nest rev	5' - cgaattgtttctctgcaactggg - 3'
hxnW upst rev	5' - gtgttcttggcgagcgatgcc - 3'
hxnM upst nest frw	5' - cgaatcccgcaaagcattctg - 3'
hxnM upst rev	5' - cgacaccgtaggatacagagaac - 3'
hxnN upst nest frw	5' - cggagaatatgtgttcgagc - 3'
hxnN upst rev	5' - cgttcttgcgactgtctgctc - 3'

## 5. melléklet

A 111 g/mol (A) és a 131 g/mol (B) molekulasúlyú vegyületek MS<sup>2</sup> tömegspektruma



## 6. melléklet

### Gomba genomok összehasonlításához alkalmazott adatok (az adatokat Michel Flippi rendezte össze)

#### hxn cluster *Aspergillus aculeatus*: size 51,822 nt

>Aspergillus aculeatus < scaffold\_11|1080376|1082357  
>A.aculeatus\_hxnZ = 1,981 nt  
< 461 nt <  
>Aspergillus aculeatus < scaffold\_11|1082818|1083972  
>A.aculeatus\_hxnY = 1,154 nt  
< 409 nt >  
>Aspergillus aculeatus > scaffold\_11|1084381|1086181  
>A.aculeatus\_hxnP = 1,800 nt  
> 283 nt >  
>Aspergillus aculeatus > scaffold\_11|1086464|1088927  
>A.aculeatus\_hxnR = 2,463 nt  
> 387 nt >  
>Aspergillus aculeatus > scaffold\_11|1089314|1093677  
>A.aculeatus\_hxnS-PHII = 4,363 nt  
> 33,173 nt <  
>Aspergillus aculeatus < scaffold\_11|1126850|1128511  
>A.aculeatus\_hxnX = 1,661 nt  
< 244 nt >  
>Aspergillus aculeatus > scaffold\_11|1128755|1129706  
>A.aculeatus\_hxnW = 951 nt  
> 245 nt >  
>Aspergillus aculeatus > scaffold\_11|1129951|1132198  
>A.aculeatus\_hxnV = 2,247 nt  
**Unlinked:**  
>Aspergillus aculeatus > scaffold\_14|1009693|1011600  
>A.aculeatus\_amidase = 1908 nt  
> 662 nt >  
>Aspergillus aculeatus > scaffold\_14|1012262|1013422  
C-N\_hydrolase  
>A.aculeatus\_HxnM = 1161 nt

#### hxn cluster *Aspergillus carbonarius*: size 20,426 nt

>Aspergillus carbonarius < scaffold\_11|974532|976267  
>A.carbonarius\_hxnX = 1,735 nt  
< 267 nt >  
>Aspergillus carbonarius > scaffold\_11|976534|977505  
>A.carbonarius\_hxnW = 971 nt  
> 252 nt >  
>Aspergillus carbonarius > scaffold\_11|977757|979958  
>A.carbonarius\_hxnV = 2,201 nt

> 347 nt <

>Aspergillus carbonarius < scaffold\_11|980305|984734  
>A.carbonarius\_hxnS-PHII = 4,429 nt  
< 480 nt >  
>Aspergillus carbonarius > scaffold\_11|985214|986441  
>A.carbonarius\_hxnT = 1,227 nt  
> 96 nt <  
>Aspergillus carbonarius < scaffold\_11|986537|989113  
>A.carbonarius\_hxnR = 2,576 nt  
< 227 nt <  
>Aspergillus carbonarius < scaffold\_11|989340|991124  
>A.carbonarius\_hxnP = 1,784 nt  
< 398 nt >  
>Aspergillus carbonarius > scaffold\_11|991522|992664  
>A.carbonarius\_hxnY = 1,142 nt  
> 385 nt >  
>Aspergillus carbonarius > scaffold\_11|993049|994958  
>A.carbonarius\_hxnZ = 1,909 nt  
**Unlinked**  
>Aspergillus carbonarius < scaffold\_20|95457|96608  
C-N\_hydrolase  
>A.carbonarius\_HxnM = 1,152 nt  
< 555 nt <  
>Aspergillus carbonarius < scaffold\_20|97163|99055  
>A.carbonarius\_amidase = 1,893 nt

#### hxn cluster *Aspergillus flavus (oryzae/sojae)*: size 19,176 nt

>gb|AAIH02000271.1|:c11456-9880 < Aspergillus flavus  
NRRL3357  
gcontig\_1106287685065  
>A.flavus\_hxnX = 1,576 nt  
< 272 nt >  
>gb|AAIH02000271.1|:11728-12678 > Aspergillus flavus  
NRRL3357  
gcontig\_1106287685065  
>A.flavus\_hxnW = 950 nt  
> 143 nt >  
>gb|AAIH02000271.1|:12821-14856 > Aspergillus flavus  
NRRL3357  
gcontig\_1106287685065

>A.flavus\_hxnV = 2,035 nt  
 < **778 nt** >  
 >gb|AAIH02000271.1|:15634-16894 > Aspergillus flavus  
 NRRL3357  
 gcontig\_1106287685065  
 >A.flavus\_hxnT = 1,260 nt  
 > **42 nt** <  
 >gb|AAIH02000271.1|:c19461-16936 < Aspergillus flavus  
 NRRL3357  
 gcontig\_1106287685065  
 >A.flavus\_hxnR = 2,525 nt  
 < **349 nt** <  
 >gb|AAIH02000271.1|:c21551-19810 < Aspergillus flavus  
 NRRL3357  
 gcontig\_1106287685065  
 >A.flavus\_hxnP = 1,741 nt  
 < **504 nt** >  
 >gb|AAIH02000271.1|:22055-23205 > Aspergillus flavus  
 NRRL3357  
 gcontig\_1106287685065  
 >A.flavus\_hxnY = 1,150 nt  
 > **423 nt** >  
 >gb|AAIH02000271.1|:23628-25549 > Aspergillus flavus  
 NRRL3357  
 gcontig\_1106287685065  
 >A.flavus\_hxnZ = 1,921 nt  
 > **2,500 nt** >  
 >gb|AAIH02000271.1|:28049-29056 > Aspergillus flavus  
 NRRL3357  
 gcontig\_1106287685065 C-N-hydrolase  
 >A.flavus\_hxnM = 1,007 nt  
**Unlinked:**  
 >gb|AAIH02000147.1|:10471-11606 Aspergillus flavus  
 NRRL3357  
 gcontig\_1106287684703  
 >A.flavus\_hxnY-2 = 1,135 nt  
 >gb|AAIH02000012.1|:c13825-11943 Aspergillus flavus  
 NRRL3357  
 gcontig\_1106287686051  
 >A.flavus\_amidase = 1,182 nt  
**hxn cluster Aspergillus kawachii (= A. niger): size 25,074  
 nt**  
 >gi|357297942:c70311-68141 < Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_hxnV = 2,170 nt

< **280 nt** <  
 >gi|357297942:c71576-70591 < Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_hxnW = 985 nt  
 < **269 nt** >  
 >gi|357297942:71845-73489 > Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_hxnX = 1,644 nt  
 > **674 nt** <  
 >gi|357297942:c78579-74163 < Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_HxnS-PHII = 4,416 nt  
 < **618 nt** >  
 >gi|357297942:79197-80405 > Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_hxnT = 1,208 nt  
 > **3,225 nt** >  
 >gi|357297942:83630-84484 > Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_nsfA = 854 nt  
 > **49 nt** <  
 >gi|357297942:c87133-84533 < Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_hxnR = 2,600 nt  
 < **290 nt** <  
 >gi|357297942:c89212-87423 < Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_hxnP = 1,789 nt  
 < **443 nt** >  
 >gi|357297942:89655-90823 > Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_hxnY = 1,168 nt  
 > **460 nt** >  
 >gi|357297942:91283-93215 > Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00152  
 >A.kawachii\_hxnZ = 1,932 nt  
**Unlinked:**  
 >gi|357297382:89305-91177 > Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00345  
 >A.kawachii\_amidase = 1,872 nt  
 > **620 nt** >  
 >gi|357297382:91797-92944 > Aspergillus kawachii IFO  
 4308 contig00345  
 C-N\_hydrolase  
 >A.kawachii\_HxnM = 1,147 nt

**hxn cluster *Aspergillus nidulans*: size 61,028 nt**

>gb|AACD01000169.1|:c330031-327832 < *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.169  
gi|259485327 ACCESSION BN001306 REGION:  
243,215..245,414  
>A.nidulans\_hxnV = 2,199 nt  
< **402 nt** <  
>gb|AACD01000169.1|:c331293-330433 < *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.169  
>A.nidulans\_hxnW = 860 nt  
< **189 nt** >  
>gb|AACD01000169.1|:331482-333063 > *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.169  
gi|259485327 ACCESSION BN001306 REGION:  
240,183..241,764  
>A.nidulans\_hxnX = 1,581 nt  
> **40,878 nt** < (15 transcripts predicted)  
>gb|AACD01000170.1|:c19017-17199 < *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.170  
gi|259485327 ACCESSION BN001306 REGION:  
197,487..199,305  
>A.nidulans\_hxnZ = 1,818 nt  
< **332 nt** <  
>gb|AACD01000170.1|:c20565-19349 < *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.170  
>A.nidulans\_hxnY = 1,216 nt  
< **587 nt** >  
>gb|AACD01000170.1|:21152-23003 > *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.170  
>A.nidulans\_hxnP = 1,851 nt  
> **300 nt** >  
>gb|AACD01000170.1|:23303-25963 > *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.170  
gi|259485327 ACCESSION BN001306 REGION:  
190,541..193,213  
>A.nidulans\_hxnR = 2,660 nt  
> **68 nt** <

>gb|AACD01000170.1|:c27332-26031 < *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.170  
>A.nidulans\_hxnT = 1,301 nt  
< **428 nt** >  
gb|AACD01000170.1|:27760-32118 > *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome IV ANcontig1.170  
gi|259485327 ACCESSION BN001306 REGION:  
184,386..188,744  
>A.nidulans\_hxnS-PHII = 4,358 nt  
**Unlinked:**  
>gb|AACD01000109.1|:c85737-84643 < *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome I ANcontig1.109 C-N\_hydrolase "**AN6518**"  
>A.nidulans\_HxnM = 1,094 nt  
< **609 nt** <  
>gb|AACD01000109.1|:c88196-86346 < *Aspergillus*  
*nidulans* FGSC A4  
chromosome I ANcontig1.109  
>A.nidulans\_amidase = 1,850 nt

**hxn cluster *Aspergillus oryzae***

>gi|83771634:c93389-91506 *Aspergillus oryzae* RIB40  
DNA, SC111  
>A.oryzae\_amidase  
>gi|83771634:c2317607-2316031 *Aspergillus oryzae*  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnX  
>gi|83771634:2317878-2318828 *Aspergillus oryzae*  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnW  
>gi|83771634:2318973-2321009 *Aspergillus oryzae*  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnV  
>gi|83771634:2321787-2323047 *Aspergillus oryzae*  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnT  
>gi|83771634:c2325614-2323089 *Aspergillus oryzae*  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnR  
>gi|83771634:c2327703-2325962 *Aspergillus oryzae*  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnP

>gi|83771634:2328211-2329360 Aspergillus oryzae  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnY  
>gi|83771634:2329788-2331709 Aspergillus oryzae  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnZ  
>gi|83771634:2334207-2335214 Aspergillus oryzae  
RIB40 DNA, SC111  
>A.oryzae\_hxnM

**Unlinked:**

>gi|83766426:c452788-451431 Aspergillus oryzae RIB40  
DNA, SC001  
>A.oryzae\_hxnTlike  
>gi|83775368:c576233-575098 Aspergillus oryzae RIB40  
DNA, SC103  
>A.oryzae\_hxnY-2

**hxn Cluster *Aspergillus sojae***

>gi|336284332:c5431-4376 Aspergillus sojae NBRC 4239  
contig00151  
>A.sojae\_HxnM  
>gi|336284332:c9873-7950 Aspergillus sojae NBRC 4239  
contig00151  
>A.sojae\_hxnZ  
>gi|336284332:11958-13706 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00151  
>A.sojae\_hxnP  
>gi|336284332:14054-16582 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00151  
>A.sojae\_hxnR  
>gi|336284332:c17886-16624 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00151  
>A.sojae\_hxnT  
>gi|336284332:c20715-18679 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00151  
>A.sojae\_hxnV  
>gi|336284332:c21809-20864 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00151  
>A.sojae\_hxnW  
>gi|336284332:22081-23656 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00151  
>A.sojae\_hxnX

**Unlinked:**

>gi|336283823:c27947-26064 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00680

>A.sojae\_amidase  
>gi|336284403:3480-5395 Aspergillus sojae NBRC 4239  
contig00080  
>A.sojae\_amidase-2  
>gi|336284439:27842-28977 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00044  
>A.sojae\_hxnY-2  
>gi|336284181:69531-70912 Aspergillus sojae NBRC  
4239 contig00303  
>A.sojae\_hxnTlike

**hxn cluster *Aspergillus terreus*: size 20,116 nt**

>gb|AAJN01000215.1|:c46727-45088 < Aspergillus  
terreus NIH2624 cont1.215  
>A.terreus\_hxnX = 1,639 nt  
< **273 nt** >  
>gb|AAJN01000215.1|:47000-47954 > Aspergillus terreus  
NIH2624 cont1.215  
>A.terreus\_hxnW = 945 nt  
> **226 nt** >  
>gb|AAJN01000215.1|:48180-50133 > Aspergillus terreus  
NIH2624 cont1.215  
>A.terreus\_hxnV = 1,953 nt  
> **71 nt** <  
>gb|AAJN01000215.1|:c54600-50204 < Aspergillus  
terreus NIH2624 cont1.215  
>A.terreus\_hxnS-PHII = 4,396 nt  
< **500 nt** >  
>gb|AAJN01000215.1|:55100-56400 > Aspergillus terreus  
NIH2624 cont1.215  
>A.terreus\_hxnT = 1,300 nt  
> **117 nt** <  
>gb|AAJN01000215.1|:c59094-56517 < Aspergillus  
terreus NIH2624 cont1.215  
>A.terreus\_hxnR = 2,577 nt  
< **296 nt** <  
>gb|AAJN01000215.1|:c61169-59390 < Aspergillus  
terreus NIH2624 cont1.215  
>A.terreus\_hxnP = 1,779 nt  
< **566 nt** >  
>gb|AAJN01000215.1|:61735-62867 > Aspergillus terreus  
NIH2624 cont1.215  
>A.terreus\_hxnY = 1,132 nt  
> **456 nt** >

>gb|AAJN01000215.1|:63323-65204 > Aspergillus terreus  
NIH2624 cont1.215

>A.terreus\_hxnZ = 1,881 nt

**Unlinked:**

>gb|AAJN01000156.1|:c64554-63488 < Aspergillus  
terreus NIH2624 cont1.156

C-N\_hydrolase

>A.terreus\_HxnM = 1,066 nt

> **485 nt** >

>gb|AAJN01000156.1|:c66899-65039 Aspergillus terreus  
NIH2624 cont1.156

>A.terreus\_amidase = 1,860 nt

**hxn cluster *Glomerella graminicola* (*Glomerellales*) : size  
40,725 nt**

>gb|ACOD01000324.1|:c55773-52579 < Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_hxnR = 3,194 nt

< **907 nt** >

>gb|ACOD01000324.1|:56680-58175 > Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_hxnX = 1,495 nt

> **412 nt** <

>gb|ACOD01000324.1|:c59997-58587 < Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_hxnT = 1,410 nt

< **2,056 nt** <

>gb|ACOD01000324.1|:c63897-62053 < Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_hxnZ = 1,844 nt

< **965 nt** <

>gb|ACOD01000324.1|:c66985-64862 < Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_hxnV = 2,123 nt

< **735 nt** >

>gb|ACOD01000324.1|:67720-69767 > Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_amidase = 2,048 nt

> **14,213 nt** <

>gb|ACOD01000324.1|:c85251-83980 < Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,271 nt

< **1,194 nt** >

>gb|ACOD01000324.1|:86445-87334 > Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_hxnW = 889 nt

> **2,467 nt** <

>gb|ACOD01000324.1|:c91571-89801 < Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_hxnP = 1,770 nt

< **530 nt** <

>gb|ACOD01000324.1|:c93304-92101 < Glomerella  
graminicola M1.001 cont1.324

>G.graminicola\_hxnY = 1,203 nt

**Unlinked:**

>gb|ACOD01000027.1|:443727-445919 Glomerella  
graminicola M1.001 cont**1.27**

(paralog omnipresent in Sordariomycetes)

>G.graminicola\_hxnV-2 = 2,192 nt

**hxn cluster *Gibberella moniliformis* (*Fusarium  
verticillioides*): size 25,506 nt**

>gb|AAIM02000142.1|:105832-106986 > Gibberella  
moniliformis 7600 chromosome 9  
cont3.142

>G.moniliformis\_hxnY = 1,154 nt

> **961 nt** >

>gb|AAIM02000142.1|:107947-109619 > Gibberella  
moniliformis 7600 chromosome 9  
cont3.142

>G.moniliformis\_hxnP = 1,672 nt

> **1,216 nt** <

>gb|AAIM02000142.1|:c111712-110835 < Gibberella  
moniliformis 7600 chromosome 9  
cont3.142

>G.moniliformis\_hxnW = 877 nt

< **519 nt** >

>gb|AAIM02000142.1|:112231-113496 > Gibberella  
moniliformis 7600 chromosome 9  
cont3.142

>G.moniliformis\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,265 nt

> **2,961 nt** >

>gb|AAIM02000142.1|:c118418-116457 < Gibberella  
moniliformis 7600 chromosome 9  
cont3.142

>G.moniliformis\_amidase = 1,961 nt

< **496 nt** >

>gb|AAIM02000142.1|:118914-120904 > Gibberella  
moniliformis 7600 chromosome 9  
cont3.142

>G.moniliformis\_hxnV = 1,990 nt  
 > **817 nt** >  
 >gb|AAIM02000142.1|:121721-123538 > Gibberella  
 moniliformis 7600 chromosome 9  
 cont3.142  
 >G.moniliformis\_hxnZ = 1,817 nt  
 > **825 nt** >  
 >gb|AAIM02000142.1|:124363-125777 > Gibberella  
 moniliformis 7600 chromosome 9  
 cont3.142  
 >G.moniliformis\_hxnT = 1,414 nt  
 > **531 nt** <  
 >gb|AAIM02000142.1|:c127773-126308 < Gibberella  
 moniliformis 7600 chromosome 9  
 cont3.142  
 >G.moniliformis\_hxnX = 1,465 nt  
 < **541 nt** >  
 >gb|AAIM02000142.1|:128314-131338 > Gibberella  
 moniliformis 7600 chromosome 9  
 cont3.142  
 >G.moniliformis\_hxnR = 3,024 nt  
**Unlinked:**  
 >gb|AAIM02000013.1|:51184-53330 > Gibberella  
 moniliformis 7600 chromosome 1  
 cont3.13 (paralog onnipresent in Sordariomycetes)  
 >G.moniliformis\_hxnV-2 = 2,146 nt  
 >gb|AAIM02000166.1|:c282445-278039 < Gibberella  
 moniliformis 7600 chromosome 3  
 cont3.166 (note: partial on edge of contig)  
 >G.moniliformis\_hxnS-PHIIPart = >4,406 nt  
 >gb|AAIM02000047.1|:c211441-208608 < Gibberella  
 moniliformis 7600 chromosome 5  
 cont3.47 (seems a relic in phylogenetic analysis)  
 >G.moniliformis\_hxnR-2 = 2,833 nt  
  
**hxn cluster *Grosmannia clavigera* (*Ophiostomatales*):  
 size 44,348 nt**  
 >gb|ACXQ02000048.1|:376723-380065 > Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_hxnR = 3,342 nt  
 > **632 nt** <  
 >gb|ACXQ02000048.1|:c376091-374972 < Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,119 nt  
 < **22,687 nt** >

>gb|ACXQ02000048.1|:350432-352285 > Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_amidase = 1,853 nt  
 > **555 nt** <  
 >gb|ACXQ02000048.1|:c349877-347890 < Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_hxnV = 1,987 nt  
 < **559 nt** <  
 >gb|ACXQ02000048.1|:c347331-345653 < Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_hxnZ = 1,678 nt  
 < **647 nt** <  
 >gb|ACXQ02000048.1|:c345006-343744 < Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_hxnT = 1,262 nt  
 < **2,163 nt** >  
 >gb|ACXQ02000048.1|:340114-341581 > Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_hxnX = 1,467 nt  
 < **374 nt** >  
 >gb|ACXQ02000048.1|:c339740-338885 < Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_hxnW = 855 nt  
 > **233 nt** <  
 >gb|ACXQ02000048.1|:336964-338652 > Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_hxnP = 1,688 nt  
 < **243 nt** <  
 >gb|ACXQ02000048.1|:335717-336721 > Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_hxnY = 1,004 nt  
**Unlinked:**  
 >gb|ACXQ02000048.1|:49692-50546 Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig\_132.1  
 >G.clavigera\_nfsA = 855 nt  
 >gb|ACXQ02000097.1|:35988-38127 Grosmannia  
 clavigera kw1407 contig 161.1  
 (paralog onnipresent in Sordariomycetes)  
 >G.clavigera\_hxnV-2 = 2,139 nt  
  
**hxn cluster *Sclerotinia sclerotiorum*: size 10,577 nt**  
 >gb|AAGT01000385.1|:c12900-8393 < Sclerotinia  
 sclerotiorum 1980 UF-70  
 strain 1980 cont1.385  
 >S.sclerotiorum\_hxnS-PHII = 4,507 nt



< **1,303 nt** <  
 >gb|AAGT01000385.1|:c16408-14203 < Sclerotinia  
 sclerotiorum 1980 UF-70  
 strain 1980 cont1.385

>S.sclerotiorum\_hxnV = 2,205 nt

< **509 nt** >

>gb|AAGT01000385.1|:16917-18970 > Sclerotinia  
 sclerotiorum 1980 UF-70  
 strain 1980 cont1.385

>S.sclerotiorum\_hxnX = 2,053 nt

#### **Unlinked**

>gb|AAID01003621.1|:c16612-15383 Botryotinia  
 fuckeliana B05.10 cont1.3621

>B.cinerea\_C-N\_hydrolase = hxnM

>gb|AAGT01000038.1|:26843-28077 Sclerotinia  
 sclerotiorum 1980 UF-70  
 strain 1980 cont1.38

>S.sclerotiorum\_C-N\_hydrolase = hxnM

#### **JGI *Hysterium pulicare* hxn clusters**

>NODE\_1220\_length\_910039\_cov\_26.360939|1797|3589  
 (1793 bp) AP

>H.pulicare\_hxnP

< **720 nt** <

>NODE\_1220\_length\_910039\_cov\_26.360939|4309|6455  
 (2147 bp) AP

>H.pulicare\_hxnV

< **490 nt** >

>NODE\_1220\_length\_910039\_cov\_26.360939|6945|8874  
 (1930 bp)

>H.pulicare\_amidase

> **609 nt** >

>NODE\_1220\_length\_910039\_cov\_26.360939|9483|1057  
 8 (1096 bp)

>H.pulicare\_hxnM

> **430 nt** >

>NODE\_1220\_length\_910039\_cov\_26.360939|11008|125  
 51 (1544 bp)

>H.pulicare\_hxnX

>NODE\_322\_length\_79727\_cov\_25.799076|43222|44559  
 (1338 bp)

>H.pulicare\_hxnY

> **12,157 nt** <

>NODE\_322\_length\_79727\_cov\_25.799076|56716|60006  
 (3291 bp) AP

>H.pulicare\_hxnR

< **685 nt** <

>NODE\_322\_length\_79727\_cov\_25.799076|60691|65200  
 (4509 bp) AP

>H.pulicare\_hxnS-PHII

< **1,010 nt** >

>NODE\_322\_length\_79727\_cov\_25.799076|66210|67623  
 (1414 bp)

>H.pulicare\_hxnT

#### **hxn clusters *Mycosphaerella fijiensis* (JGI genome)**

##### **hxn Cluster 1: size 9,766 nt**

>Mycosphaerella fijiensis > scaffold\_5|802739|804266  
 (1528 bp)

>M.fijiensis\_hxnX = 1,527 nt

> **210 nt** <

>Mycosphaerella fijiensis < scaffold\_5|804476|806425  
 (1950 bp) AP

>M.fijiensis\_hxnV = 1,949 nt

< **398 nt** >

>Mycosphaerella fijiensis > scaffold\_5|806823|807820  
 (998 bp)

>M.fijiensis\_hxnM = 997 nt

> **372 nt** >

>Mycosphaerella fijiensis > scaffold\_5|808192|809412  
 (1221 bp)

>M.fijiensis\_hxnT = 1,220 nt

> **467 nt** >

>Mycosphaerella fijiensis > scaffold\_5|809879|812505  
 (2627 bp)

>M.fijiensis\_hxnR = 2,626 nt

##### **hxn Cluster 2: size 6,057 nt (unlinked to Cluster 1)**

>Mycosphaerella fijiensis < scaffold\_2|4950804|4952022  
 (1219 bp) AP

>M.fijiensis\_hxnY = 1,218 nt

< **417 nt** <

>Mycosphaerella fijiensis < scaffold\_2|4952439|4956861  
 (4423 bp) AP

>M.fijiensis\_hxnS-PHII = 4,422 nt

##### **hxn cluster *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. *pisi*): size 21,236 nt**

>gb|ACJF01000056.1|:c115648-112600 < Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4

chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56

>N.haematococca\_hxnR = 3,048 nt

< **696 nt** >  
 >gb|ACJF01000056.1|:116344-117829 > Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
 chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56  
 >N.haematococca\_hxnX = 1,485 nt  
 > **521 nt** <  
 >gb|ACJF01000056.1|:c119760-118350 < Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
 chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56  
 >N.haematococca\_hxnT = 1,410 nt  
 < **829 nt** <  
 >gb|ACJF01000056.1|:c122416-120589 < Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
 chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56  
 >N.haematococca\_hxnZ = 1,827 nt  
 < **1,059 nt** <  
 >gb|ACJF01000056.1|:c125483-123475 < Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
 chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56  
 >N.haematococca\_hxnV = 2,008 nt  
 < **1,112 nt** <  
 >gb|ACJF01000056.1|:c127890-126595 < Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
 chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56  
 >N.haematococca\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,295 nt  
 < **573 nt** >  
 >gb|ACJF01000056.1|:128463-129330 > Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
 chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56  
 >N.haematococca\_hxnW = 867 nt  
 > **545 nt** <  
 >gb|ACJF01000056.1|:c131616-129875 < Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
 chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56  
 >N.haematococca\_hxnP = 1,741 nt  
 < **1,065 nt** <  
 >gb|ACJF01000056.1|:c133836-132681 < Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
 chromosome 12 NECHAsca\_56\_chr12\_3\_0\_Cont56  
 >N.haematococca\_hxnY = 1,155 nt  
**Unlinked:**  
 >gb|ACJF01000001.1|:c1859194-1857044 Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
**chromosome 1** NECHAsca\_1\_chr1\_3\_0\_Cont1 (paralog  
 omnipresent in Soradariomycetes)

>N.haematococca\_hxnV-2 = 2,150 nt  
 >gb|ACJF01000017.1|:589089-593861 Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
**chromosome 4** NECHAsca\_19\_chr4\_3\_0\_Cont17  
 >N.haematococca\_hxnS-PHII = 4,772 nt  
 >gb|ACJF01000029.1|:82980-84527 Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
**chromosome 11** NECHAsca\_30\_chr11\_1\_0\_Cont29  
 (duplication hxnP)  
 >N.haematococca\_hxnP-2 = 1,547 bp  
 >gb|ACJF01000048.1|:138132-139914 Nectria  
 haematococca mpVI 77-13-4  
**chromosome 16** NECHAsca\_50\_chr16\_1\_0\_Cont48  
 (duplication hxnZ)  
 >N.haematococca\_hxnZ-2 = 1,782 nt  
  
**hxn cluster *Paracoccidioides brasiliensis* strain Pb03:**  
**size 29,109 nt**  
 >gb|ABHV01000435.1|:c108721-106610 <  
 Paracoccidioides brasiliensis Pb03 cont1.435  
 >P.brasiliensis\_hxnX = 2,111 nt  
 < **1,234 nt** <  
 >gb|ABHV01000435.1|:c111187-109955 <  
 Paracoccidioides brasiliensis Pb03 cont1.435  
 >P.brasiliensis\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,232 nt  
 < **748 nt** >  
 >gb|ABHV01000435.1|:111935-113171 >  
 Paracoccidioides brasiliensis Pb03 cont1.435  
 >P.brasiliensis\_hxnW = 1,236 nt  
 > **277 nt** <  
 >gb|ABHV01000435.1|:c115503-113448 Paracoccidioides  
 brasiliensis Pb03 cont1.435  
 >P.brasiliensis\_amidase = 2,055 nt  
 < **843 nt** >  
 >gb|ABHV01000435.1|:116346-118588 >  
 Paracoccidioides brasiliensis Pb03 cont1.435  
 >P.brasiliensis\_hxnV = 2,242 nt  
 > **5,497 nt** <  
 >gb|ABHV01000435.1|:c128734-124085 <  
 Paracoccidioides brasiliensis Pb03 cont1.435  
 >P.brasiliensis\_hxnS-PHII = 4,649 nt  
 < **1,613 nt** >  
 >gb|ABHV01000435.1|:130347-131828 >  
 Paracoccidioides brasiliensis Pb03 cont1.435  
 >P.brasiliensis\_hxnT = 1,481 nt

> **604 nt** <

>gb|ABHV01000435.1|:c135719-132432

Paracoccidioides brasiliensis Pb03 cont1.435

>P.brasiliensis\_hxnR = 3,287 nt

**hxn cluster *Phaeosphaeria nodorum*: size 26,464 nt**

(similar in *Leptosphaeria maculans*)

>gb|AAGI01000083.1|:c80177-78587 < *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.83

>P.nodorum\_hxnP = 1,590 nt

< **546 nt** <

>gb|AAGI01000083.1|:c82711-80723 < *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.83

>P.nodorum\_hxnV = 1,988 nt

< **586 nt** >

>gb|AAGI01000083.1|:83297-85333 > *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.83

>P.nodorum\_amidase = 2,037 nt

> **362 nt** >

>gb|AAGI01000083.1|:85695-86878 *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.83

>P.nodorum\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,183 nt

> **697 nt** >

>gb|AAGI01000083.1|:87575-89121 > *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.83

>P.nodorum\_hxnX = 1,546 nt

> **5,273 nt** <

>gb|AAGI01000083.1|:c95736-94394 < *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.83

>P.nodorum\_hxnT = 1,342 nt

< **521 nt** >

>gb|AAGI01000083.1|:96257-100778 > *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.83

>P.nodorum\_hxnS-PHII = 4,521 nt

> **957 nt** >

>gb|AAGI01000083.1|:101735-105051 > *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.83

>P.nodorum\_hxnR = 3,316 nt

**Unlinked:**

>gb|AAGI01000408.1|:18330-19495 *Phaeosphaeria nodorum* SN15 cont1.408

>P.nodorum\_hxnY = 1,165 nt

**hxn cluster *Pyrenophora tritici-repentis*: size 26,464 nt**

(similar in *P. teres* f. sp. *teres*, *Alternaria brassicicola*, *Cochliobolus heterostrophus* (C5), *C. sativus*, and *Setosphaeria turcica*)

>gb|AAXI01000364.1|:c6301-4979 < *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP

cont1.364

>P.tritici-repentis\_hxnT = 1,322 nt

< **542 nt** >

>gb|AAXI01000364.1|:6843-11423 > *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP

cont1.364

>P.tritici-repentis\_hxnS-PHII = 4,580 nt

> **882 nt** >

>gb|AAXI01000364.1|:12305-15633 > *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP

cont1.364

>P.tritici-repentis\_hxnR = 3,328 nt

> **8,001 nt** <

>gb|AAXI01000364.1|:c25623-23634 < *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP

cont1.364

>P.tritici-repentis\_hxnV = 1,989 nt

< **603 nt** >

>gb|AAXI01000364.1|:26226-28180 > *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP

cont1.364

>P.tritici-repentis\_amidase = 1,955 nt

> **428 nt** >

>gb|AAXI01000364.1|:28608-29803 > *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP

cont1.364

>P.tritici-repentis\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,195 nt

> **576 nt** >

>gb|AAXI01000364.1|:30379-31864 > *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP

cont1.364

>P.tritici-repentis\_hxnX = 1,485 nt

**Unlinked:**

>gb|AAXI01000374.1|:46051-47226 *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP

cont1.374 hyoscyamine 6-dioxygenase

>P.tritici-repentis\_hxnY = 1,175 nt

**hxn cluster *Talaromyces stipitatus*: size 18,505 nt**

>gb|ABAS01000027.1|:c141724-140140 < *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500  
gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_hxnX = 1,584 nt  
< **242 nt** >  
>gb|ABAS01000027.1|:141966-142935 > *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500  
gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_hxnW = 969 nt  
> **164 nt** >  
>gb|ABAS01000027.1|:143099-145121 > *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500  
gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_hxnV = 2,022 nt  
< **380 nt** >  
>gb|ABAS01000027.1|:145501-146761 > *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500 gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_hxnT = 1,260 nt  
> **42 nt** <  
>gb|ABAS01000027.1|:c149321-146803 < *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500 gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_hxnR = 2,518 nt  
< **401 nt** <  
>gb|ABAS01000027.1|:c151435-149722 < *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500 gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_hxnP = 1,713 nt  
< **513 nt** >  
>gb|ABAS01000027.1|:151948-153101 > *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500 gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_hxnY = 1,153 nt  
> **410 nt** >  
>gb|ABAS01000027.1|:153511-155432 > *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500 gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_hxnZ = 1,921 nt  
> **2,156 nt** >  
>gb|ABAS01000027.1|:157588-158645 > *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500  
gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,057 nt  
> **4,152 nt** <  
>gb|ABAS01000027.1|:c164802-162797 *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500  
gcontig\_1105507295319  
>T.stipitatus\_amidase = 2,005 nt

**hxn genes *Tuber melanosporum* (Pezizomycetes class)**

>gi|295506971:c139110-134465 < *Tuber melanosporum*, contig\_281, strain Mel28  
>T.melanosporum\_hxnS-PHII = 4,645 nt  
< **24,323 nt** < (sort of linked)  
>gi|295506971:c165432-163433 < *Tuber melanosporum*, contig\_281, strain Mel28  
>T.melanosporum\_hxnV = 1,999 nt  
< **1,913 nt** >  
>gi|295506971:167345-169712 > *Tuber melanosporum*, contig\_281, strain Mel28  
>T.melanosporum\_amidase = 2,368 nt  
>gi|295506963:c35050-34134 < *Tuber melanosporum*, contig\_289, strain Mel28  
>T.melanosporum\_hxnW = 916 nt  
> **1,835 nt** >  
>gi|295506963:36885-38039 *Tuber melanosporum*, contig\_289, strain Mel28  
>T.melanosporum\_C-N\_hydrolase = hxnM = 1,154 nt  
> **1,365 nt** >  
>gi|295506963:39404-40979 > *Tuber melanosporum*, contig\_289, strain Mel28  
>T.melanosporum\_hxnX = 1,575 nt  
>gi|295506708:c28786-25662 < *Tuber melanosporum*, contig\_546, strain Mel28  
>T.melanosporum\_hxnS-2-PHIIPseudo = 1,124 nt  
>gi|295503925:c37502-36163 < *Tuber melanosporum*, contig\_1329, strain Mel28  
>T.melanosporum\_hxnT = 1,339 nt  
>gi|295503655:c75591-71270 < *Tuber melanosporum*, contig\_1599, strain Mel28  
>T.melanosporum\_hxA-PHI = 4,321 nt

**hxn cluster *Botryosphaeria dothidea***

anamorph: *Dothiorella berengeriana* or *Fusicoccum aesculi*  
Dothideomycetes; Dothideomycetes incertae sedis; Botryosphaeriales; Botryosphaeriaceae; Botryosphaeria  
>NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|12060|1462 3 (2564 bp) AP  
>B.dothidea\_amidase  
< **741 nt** >  
>NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|15364|1763 0 (2267 bp)  
>B.dothidea\_hxnV

> **4,470 nt** <  
 >NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|22100|2360  
 7 (1508 bp) AP  
 >B.dothidea\_hxnX  
 < **605 nt** <  
 >NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|24212|2534  
 4 (1133 bp) AP  
 >B.dothidea\_hxnM  
 < **946 nt** <  
 >NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|26290|2760  
 2 (1313 bp) AP  
 >B.dothidea\_hxnT  
 < **605 nt** >  
 >NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|28207|3280  
 3 (4597 bp)  
 >B.dothidea\_HxnS-PHII  
 > **2,197 nt** >  
 >NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|35000|3869  
 6 (3697 bp)  
 >B.dothidea\_hxnR  
 > **2,009 nt** <  
 >NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|40795|4224  
 0 (1446 bp) AP  
 >B.dothidea\_hxnY  
 < **692 nt** >  
 >NODE\_1365\_length\_49077\_cov\_59.050289|42932|4476  
 9 (1838 bp)  
 >B.dothidea\_hxnZ  
**Unlinked**  
 >NODE\_8152\_length\_150613\_cov\_65.218796|92352|942  
 72 (1921 bp)  
 >B.dothidea\_hxnP  
 >NODE\_3726\_length\_70215\_cov\_61.707100|17790|1861  
 7 (828 bp)  
 >B.dothidea\_hxnWlike

**Remnant hxn cluster *Neosartorya fischeri*: size 9,283 nt**

>gb|AAKE03000012.1|:159786-164138 > *Neosartorya*  
*fischeri* NRRL 181  
 ctgupdate\_1099437635460  
 >N.fischeri\_hxnS-PHII = 4,352 nt  
 > **41 nt** <  
 >gb|AAKE03000012.1|:c166230-164179 < *Neosartorya*  
*fischeri* NRRL 181  
 ctgupdate\_1099437635460

>N.fischeri\_hxnV = 2,051 nt  
 < **1,207 nt** >  
 >gb|AAKE03000012.1|:167437-169069 > *Neosartorya*  
*fischeri* NRRL 181  
 ctgupdate\_1099437635460  
 >N.fischeri\_hxnX = 1,632 nt  
**Unlinked:**  
 >gb|AAKE03000023.1|:291704-292828 *Neosartorya*  
*fischeri* NRRL 181  
 ctgupdate\_1099437635428  
 >N.fischeri\_hxnY = 1,124 nt  
 >gb|AAKE03000001.1|:1598703-1599742 *Neosartorya*  
*fischeri* NRRL 181  
 ctgupdate\_1099437635467 C-N\_hydrolase  
 >N.fischeri\_hxnM-2  
 >gb|AAKE03000001.1|:c133414-132091 *Neosartorya*  
*fischeri* NRRL 181  
 ctgupdate\_1099437635467  
 >N.fischeri\_hxnTlike  
 >gb|AAKE03000040.1|:25777-27652 > *Neosartorya*  
*fischeri* NRRL 181  
 ctgupdate\_1099437635404  
 >N.fischeri\_amidase = 1,875 nt  
 > **657 nt** >  
 >gb|AAKE03000040.1|:28309-29420 > *Neosartorya*  
*fischeri* NRRL 181  
 ctgupdate\_1099437635404 C-N\_hydrolase  
 >N.fischeri\_hxnM = 1,111 nt